Durchflußcytometrische Untersuchungen zum Glutathionstoffwechsel von intakten Zellen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JÜRGEN TREUMER
aus Flensburg

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0057

Durchflußcytometrische Untersuchungen zum Glutathionstoffwechsel von intakten Zellen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
JÜRGEN TREUMER
aus Flensburg

1986

Druck Hans-Joachim Köhler, Tübingen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.1986

Dekan:	Prof. Dr. D. Mecke
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Wendel

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen und am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. G. Valet in der Zeit von November 1983 bis Mai 1986 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Valet danke ich für stete Betreuung, wissenschaftliches Interesse und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke gilt mein Dank für eine umfassende biochemische Ausbildung, sowie für seine Bereitschaft, die Arbeit vor der Fakultät zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. A. Wendel danke ich für viele Anregungen und auch manche kritische Diskussion.

Besonderen Dank schulde ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Valet, die mir durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft viele Probleme zu lösen halfen.

Meiner Familie danke ich für Verständnis, Geduld und Unterstützung während dieser Zeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	Seite
1.	**EINLEITUNG**	1
2.	**MATERIAL UND METHODEN**	8
2.1.	Chemikalien	8
2.2.	Pufferlösungen	9
2.3.	Zellkulturen	9
2.3.1.	Medien, Lösungen	9
2.3.2.	Durchführung	9
2.3.3.	Cytostatischer Ansatz	10
2.4.	In vivo Tumorpassagen	10
2.4.1.	Versuchstiere	10
2.4.2.	R3230AC Tumor	11
2.4.3.	Lewis Lung Tumor	11
2.4.4.	Ehrlich Ascites Tumor	11
2.5.	Gewinnung von Einzelzellsuspensionen	12
2.5.1.	Aus Zellkultur	12
2.5.2.	Aus soliden Tumoren	12
2.6.	GSH-Bestimmung an Zellhomogenaten	13
2.6.1.	Aufarbeiten des Zellmaterials	13
2.6.2.	Bestimmung mit OPT	13
2.6.3.	Bestimmung mit DTNB	13
2.6.4.	Proteinbestimmung nach Lowry	14
2.7.	HPLC	15
2.7.1.	Ausrüstung	15
2.7.2.	Laufpuffer	15
2.7.3.	Analytische Trennung	16
2.7.4.	Präparative Trennung	16
2.7.5.	Dünnschichtchromatografie	17
2.8.	Fluoreszenzspektroskopie	17
2.9.	Fluoreszenzmikroskopie	17
2.10.	Durchflußcytometrie	18
2.10.1.	Ausrüstung	18

2.10.2. Meßprinzip 19
2.10.3. Datenverarbeitung 20
2.10.4. Eichpartikel 21
2.10.5. ADB/PI-Färbung 21
2.10.6. Bromobimane-Färbung 22
2.10.7. OPT-Färbung 22
2.10.8. OPT/PI-Färbung 23

3. ERGEBNISSE 25

3.1. Untersuchungen mit dem Fluorimeter 25
3.1.1. Reaktion von OPT mit GSH 25
3.1.2. Reaktion von MB mit GSH 25
3.1.3. OPT-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der GSH-Konzentration 25
3.1.4. Einfluß von Thiolblockern auf die Reaktion mit GSH 26
3.1.5. Reaktion von OPT mit Aminosäuren 27
3.1.6. Reaktion von OPT mit GSH in Gegenwart von Aminosäuren 28
3.1.7. Reaktion von MB mit Aminosäuren 28
3.1.8. Reaktion von OPT mit Proteinen 30
3.1.9. Spontanhydrolyse von Bromobimanen 30
3.1.10. Nicht-enzymatische Oxidation von GSH 32
3.1.11. Einfluß des pH auf die Reaktion von OPT mit GSH 32
3.2. Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop 34
3.2.1. Färbung mit OPT/PI 34
3.2.2. Effekt von PZ51 34
3.3. Untersuchungen mit der HPLC 36
3.3.1. Auftrennung von Lysaten OPT-gefärbter Zellen 36
3.3.2. Einfluß von SDS auf die Fluoreszenzverteilung 36
3.3.3. Einfluß der OPT-Konzentration 38
3.3.4. Spektrale Charakterisierung OPT-gefärbter Zellbestandteile 40
3.3.5. Einfluß von Thiolblockern auf die Reaktion mit OPT 40

3.3.6.	Einfluß von Oxidantien auf die Reaktion mit OPT	42
3.3.7.	Präparatives Gelsieb und Dünnschichtchromatografie	42
3.3.8.	Auftrennung von Lysaten MB-gefärbter Zellen	45
3.4.	Durchflußcytometrie	46
3.4.1.	Färbungen	46
3.4.1.1.	OPT/PI	46
3.4.1.2.	Thiolreaktive Farbstoffe	49
3.4.1.3.	ADB/PI	49
3.4.2.	Unterschiedliches Zellmaterial nach OPT-Färbung	51
3.4.3.	Einfluß des intracellulären Thiolgehalts	51
3.4.3.1.	Einsatz von Thiolblockern	53
3.4.3.1.1.	Wirkung auf OPT-Färbung	53
3.4.3.1.2.	Vergleich mit Bromobimane MB-Färbung	57
3.4.3.2.	Einsatz von Thioloxidantien	58
3.4.3.2.1.	Wirkung auf OPT-Färbung	58
3.4.3.2.2.	Vergleich mit Bromobimane MB und ADB Färbung	60
3.4.3.3.	Einsatz von Enzyminhibitoren	63
3.4.3.4.	Weitere Beeinflussungen	65
3.4.4.	Korrelation zwischen OPT-FCM und konventionellen GSH-Bestimmungen	69
3.4.4.1.	Einsatz von Cysteamin	69
3.4.4.2.	Einsatz von Peroxiden	69
3.4.5.	Wirkung von Chemotherapeutika auf OPT-Färbung	71
3.4.6.	Wirkung von PZ51 (Ebselen) auf OPT-Färbung	73
3.4.7.	Unterschiede zwischen Tumorzellen und Lymphocyten	76
4.	**DISKUSSION**	78
5.	**ZUSAMMENFASSUNG**	94
6.	**LITERATURVERZEICHNIS**	96

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADB	1,4-Acetoxy-2,3-dicyanobenzol
BCNU	1,3-Bis(2-chloroethyl)- -1-nitrosoharnstoff
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
CCNU	1-(2-chloroethyl)-3-(cyclohexyl)- -1-nitrosoharnstoff
CHO	Ovarialzellkultur
CuOOH	Cumolhydroperoxid
DC	Dünnschichtchromatografie
DCH	2,3-Dicyanohydrochinon
DEM	Diethylmaleat
DMF	Dimethylformamid
DTNB	5-5'-Dithio-bis-(2-nitro- benzoesäure)
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
E_{xxx}	Extinktion bei xxx nm
F1	Fluoreszenzwellenlängenbereich 1
F2	Fluoreszenzwellenlängenbereich 2
FA	Formaldehyd
FCS	fötales Kälberserum
FI	Fluoreszenzindikator
FCM	Durchflußcytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G/V	Gewicht zu Volumen
GOD	Glucoseoxidase
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSH-Px	Glutathionperoxidase
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HeCCNU	1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxy- ethyl)-1-nitosoharnstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin- -N'-ethansulfonsäure

$HgCl_2$	Quecksilberchlorid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-chromatografie
HNMR	Protonen-Kernspin-Resonanz
i.p.	intraperitoneal
K_m	Michaeliskonstante
LPO	Lipidperoxidation
MeCCNU	1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclo-hexyl)-1-nitrosoharnstoff
MG	Molekulargewicht
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
MPX	Peroxidase aus Meerrettich
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduzierte Form
NEM	N-Ethylmaleimid
OPT	ortho-Phthaldialdehyd
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCMS	para-Chloromercuriphenylsulfonsäure
PI	Propidiumjodid
PZ51	2-Phenyl-1,2-benzoisoselenazol--3(2H)on
SDS	Natriumdodecylsulfat
tbuOOH	tert.-Butylhydroperoxid
Thiolyte MB,DB	Monobromobimane, Dibromobimane
Thiolyte MQ	Monobromotrimethylammoniobimane
RT	Raumtemperatur
TBS	TRIS-gepufferte Saline
TRIS	Tris(hydromethyl)-aminomethan
U	Einheit Enzymaktivität
V	Volumen
V_k	Variationskoeffizient
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$ZnCl_2$	Zinkchlorid

1. EINLEITUNG

Seit seiner Isolierung und Charakterisierung durch Hopkins 1921 **(1),(2)** erfährt Glutathion und dessen Stoffwechsel ständig steigende Beachtung. Begründet liegt das in der vielschichtigen Beteiligung am gesamten Zellmetabolismus und in den einzigartigen, biochemischen Eigenschaften dieses Moleküls **(3)**. Dabei zeigt sich, daß die gezielte Funktionsprüfung des Glutathion-Systems einen guten Meßparameter cellulärer Vitalität darstellt **(4)**. Hiermit ist die Fähigkeit von Zellen gemeint, angemessen zu reagieren auf Belastungen, die sich aus ihrem 'normalen' Metabolismus ergeben, besonders jedoch auf Streßsituationen, wie sie durch Chemotherapeutika, Strahlen und Xenobiotica verursacht werden. Zum Verständnis der Reaktionen, an denen Glutathion in diesem Sinne beteiligt ist, sind Kenntnisse der Struktur und Reaktionsmöglichkeiten der Substanz vonnöten, die im folgenden kurz vermittelt werden.

Glutathion (GSH) ist ein lineares Tripeptid mit der Sequenz GLU-CYS-GLY **(Abb.1.1.)**, wobei Glutamat über die gamma-Carboxylgruppe gebunden ist. Dies unterscheidet es von der bei Peptiden sonst üblichen alpha-Bindung. Als funktionelle Gruppen stehen zwei Carboxy-, eine Amino- und eine Thiolgruppe zur Verfügung; letztere prägt das chemische Verhalten des Gesamtmoleküls: Die Thiolgruppe hat einen pKa 8.6 - 9.2 **(5),(6)**, liegt damit im physiologischen pH zum Teil als geladenes Thiolat RS^- vor und zeigt ausgeprägte Nucleophilie **(7)**. Eine herausragende Eigenschaft der reduzierten Thiolgruppe ist ihre Fähigkeit zur Reaktion mit weiteren reduzierten Thiolgruppen (z.B GSH): in einem Oxidationsschritt treten beide Moleküle zum Disulfid (GS-SG) zusammen, wobei ein geeigneter Akzeptor Elektronen aufnimmt und damit reduziert wird. Zusammen mit den Enzymen, die für Aufbau und Abbau des Glutathions zuständig sind, existiert in fast jeder Zelle (Ausnahme: Entamoeba histolytica **(8)**) ein regelrechter

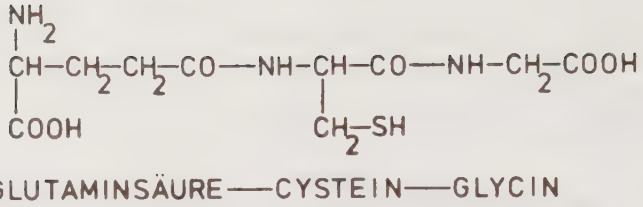


Abb.1.1. Strukturformel Glutathion, reduzierte Form (GSH). Lineares Peptid aus drei Aminosäuren, γ-Bindung zwischen Glutaminsäure und Cystein. Amino- und Carboxyfunktionen sind in wäßriger Lösung geladen (Zwitterion), bei physiologischem pH (7.4) ein Teil der Thiolgruppen ebenfalls (Thiolat).

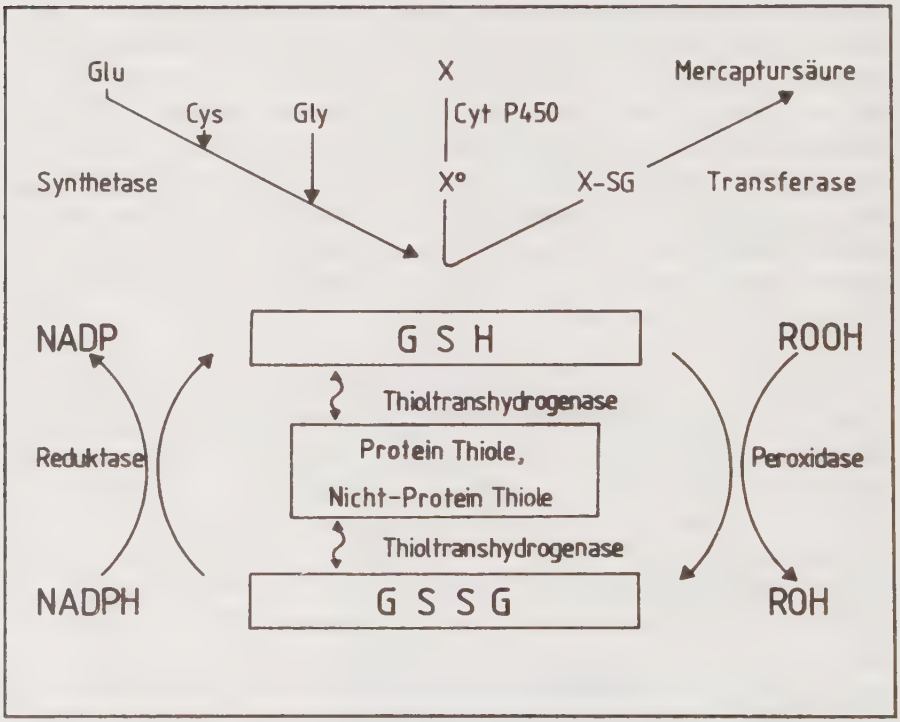


Abb.1.2. Glutathionzyklus. Reduziertes Glutathion (**GSH**) besitzt zentrale Bedeutung für die Umwandlung von Hydroperoxiden (**ROOH**) zu Alkoholen (**ROH**) bzw. Wasser. Nachschub erfolgt durch Reduktion der oxidierten Form (**GSSG**) oder durch Neusynthese aus den Vorläufer-Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin unter ATP-Verbrauch. Weitere Funktionen: Entgiftung von Xenobiotica (**X**), die zuvor über das Cytochrom P_{450} aktiviert wurden (**X^O**), als Glutathionkonjugat (**X-SG**) und Mercaptursäurederivat; Redoxpuffer für Thiole von Proteinen und niedermolekularen Substanzen, katalysiert durch Thioltranshydrogenasen.

GSH-Zyklus **(Abb.1.2.)**, der mehrere Aufgaben wahrnimmt:

a) Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) ist für Abfang und Entgiftung aktiver Sauerstoffspecies zuständig **(9)**. Hierunter fallen vor allem Radikale und Peroxide ('ROOH') mit ihrer für jede Zelle fatalen Eigenschaft, Lipidperoxidationen zu initiieren und damit Membranlysis und Zelltod zu verursachen **(10),(11)**. Zwar sind viele Zellen zusätzlich mit Catalase als weiterem Schutzenzym ausgestattet, durch deren Aktivität eine Umsetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu H_2O auch ohne GSH-Verbrauch katalysiert wird. Dieses Enzym unterscheidet sich aber von der GSH-Px durch wesentlich höhere Werte für K_m und V_{max} **(12)**. Daraus geht hervor, daß die Aktivität der Catalase eher auf den Abfang hoher Mengen H_2O_2 ausgerichtet ist, obwohl sie auch schon bei geringeren Konzentrationen eine Rolle spielen kann **(13)**. Außerdem ist die intracelluläre Kompartimentierung von Bedeutung: in Hepatocyten sind beide Enzyme genau komplementär lokalisiert **(14)**. Der wichtigste Unterschied besteht jedoch in der Substratspezifität, da Catalase längerkettige Alkylhydroperoxide nicht umsetzen kann **(15),(16)** und somit eine bereits begonnene Lipidperoxidation nicht mehr aufzuhalten vermag. Im Gegensatz dazu akzeptiert die GSH-Peroxidase auch Fettsäure- und Lipidhydroperoxide **(17),(18)** und terminiert damit den Prozeß. Im Laufe der Reaktion wird das Peroxid zum entsprechenden Alkohol ('ROH') umgesetzt und GSH zu GSSG oxidiert. Eine Regeneration des Glutathions erfolgt über die GSSG-Reduktase unter $NADPH/H^+$-Verbrauch. Dieser Zyklus ist von großer Wichtigkeit, da im Verlauf verschiedener Reaktionen ständig endogenes Peroxid erzeugt wird, zum Beispiel durch Enzymaktivitäten der Glucose-Oxidase oder NADPH-Oxidase (Übersicht **(19)**). Zusätzlich entstehen Peroxide auch in Streßsituationen, zum Beispiel durch Medikamente **(20),(21),(22)**, sowie unter Einwirkung ionisierender Strahlung **(23),(24)**, wobei höhere Konzentrationen reaktiver Moleküle anfallen, die über den GSH-Zyklus zu beseitigen sind.

b) Ein anderer Entgiftungsschritt, der im Gegensatz zur reversiblen Oxidation des Glutathions zum irreversiblen Verlust des gesamten Moleküls führt, ist die durch Glutathion-S-Transferasen katalysierte Übertragung von GSH auf eine große Anzahl durch das Cytochrom P_{450}-System aktivierbarer Fremdstoffe ('X') **(25),(26)**. Diese werden dann als Mercaptursäurederivate **(27)** effizient renal ausgeschieden. Bei der hauptsächlich in der Leber ablaufenden Reaktion dient GSH als Schutzsubstanz, die an den aktivierten, elektrophilen Fremdstoff ('X^{O}') bindet, bevor dieser Gelegenheit zur Bindung an 'sensible' Moleküle wie DNA und Protein erhält. Entscheidend für den Ablauf dieser Reaktion ist die hohe Nucleophilie der GSH-Thiolgruppe.

c) Glutathion kommt in den meisten Zellen in einer Konzentration von 1-5 mM vor **(3)**. Es ist damit mengenmäßig das wichtigste Nicht-Protein-Thiol und fungiert als wichtiger Redoxpuffer. Ermöglicht wird diese Funktion durch die Fähigkeit des GSH zur reversiblen Reaktion mit Thiolgruppen von Proteinen, Peptiden und Cysteinmolekülen. Dabei werden entweder reduzierend Disulfidbrücken geöffnet (Beispiel: Insulinabbau, **(28)**) oder aber durch Oxidation geschlossen (Beispiel: mixed disulfides **(29)**). Außerdem kann eine Austauschreaktion auftreten , in deren Verlauf GSH einen Bindungspartner aus der Disulfidbindung verdrängt **(30)**. Mit diesen Mechanismen besitzt die Zelle effiziente Möglichkeiten, um über die Lage des GSH-/ GSSG-Gleichgewichts unmittelbar den Redoxzustand von Protein-Thiolfunktionen zu beeinflussen. Da Disulfidbrücken wichtige Strukturelemente der Proteinkonformation darstellen, können durch solche Mechanismen wirksam Enzymaktivitäten reguliert werden **(31)**. Besonders die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) erweist sich als potenter Modulator von Schrittmacherenzymen wie Phosphofructokinase **(32)** oder Glycogen Synthase D **(33)** und ist deshalb schon als "third messenger" bezeichnet worden **(32)**.

d) Weitere Beteiligungen des Glutathions am Stoffwechselgeschehen sollen nur stichwortartig genannt werden und umfassen: Prostaglandinbiosynthese **(34)**, Proteinbiosynthese **(35)**, DNA-Synthese **(36)**, Aminosäuretransport **(37)**, Freisetzung von Neurotransmittern **(38)**, Aufrechterhaltung von Membranfunktionen **(39)**, Assemblierung von Tubulin während der Mitose **(40)**, Aktivierung von Lymphocyten **(41)**, Entstehung von Katarakten (Augenlinsentrübung) **(42)**, Calciummetabolismus **(43)**.

Aus der Vielzahl der angeführten Beteiligungen geht hervor, daß ein intakter Glutathionstatus (Quotient GSH / GSSG) für jede Zelle von zentraler Bedeutung ist. Üblicherweise liegt die intracelluläre GSH-Konzentration um den Faktor 10^2 - 10^3 über dem GSSG-Gehalt **(3)**. Damit werden permanent große Mengen an reduziertem Glutathion benötigt, was aus mehreren Quellen requiriert werden kann. Hauptlieferanten sind:

1. Eine ausgeprägte GSH-Biosynthese aus den Vorläufer-Aminosäuren unter ATP-Verbrauch. Die sehr kurzen Halbwertszeiten von 2-6 Stunden belegen, daß ständig große Mengen GSH neu produziert werden **(3)**.

2. Die Aktivierung von Glutathion durch Reduktion von GSSG oder proteingebundenem Glutathion. Der hier gebundene Anteil kann durchaus bis zu 35% des Gesamtgehalts ausmachen **(44),(45)**.

Insgesamt stellt der Glutathionzyklus ein komplexes System mehrerer Fließgleichgewichte dar, und es ist zu erwarten, daß sich schon geringe Störungen dieses Systems deutlich im intracellulären Glutathionstatus manifestieren. Leider benötigt die klassische Biochemie zur Messung solcher Änderungen große Zellmengen und liefert nach zeitintensiver Aufarbeitung trotzdem nur Mittelwerte aller im Ansatz vorhandenen Zellen. Hier ist der Ansatzpunkt für die Durch-

flußcytometrie (engl. flow cytometry, FCM) mit ihren typischen Vorteilen: Es wird nur wenig Zellmaterial ($<10^4$ Zellen) bei minimaler Gewebsaufarbeitung benötigt, und die Meßzeiten liegen im Sekundenbereich. Gleichzeitige Bestimmungen mehrerer Zelleigenschaften wie Volumen, intracellulärer pH und DNA-Gehalt sind problemlos möglich, wobei jede einzelne Zelle mit ihrem eigenen Meßwert erfaßt wird.

Im Prinzip besteht ein Durchflußcytometer aus einer Meßkammer, in der nach dem Coulter-Prinzip das Zellvolumen elektrisch bestimmt wird. Beim Durchtritt durch die Meßöffnung wird die Zelle gleichzeitig mit einer starken Lichtquelle (Laser, Hg-Lampe) intensiv angeregt. Das von der gefärbten Zelle emittierte Fluoreszenzlicht wird durch Dichroit-Spiegel und Filter in seine spektralen Bestandteile zerlegt und mit Photoröhren gemessen. Die rechnerische Auswertung der so erhaltenen Daten erlaubt eine Zuordnung jeder einzelnen Zelle in eine mehrdimensionale Matrix, aus der Zellen oder Populationen abgetrennt betrachtet werden können, was ohne eine Mehrparametermessung unmöglich wäre.

Erst durch die Entwicklung leistungsfähiger Computer und geeigneter Auswertungsprogramme wird die Durchflußcytometrie als Meßverfahren überhaupt durchführbar. Gleichzeitig steht und fällt die FCM mit der Verfügbarkeit von geeigneten Fluoreszenzfärbungen. An diese Farbstoffe stellen sich stets die gleichen Forderungen:

- -) hohe Spezifität hinsichtlich des zu bestimmenden Moleküls
- -) ausreichend detektierbare Änderung der Fluoreszenzeigenschaften nach Reaktion mit dem Zielmolekül
- -) Membranpermeabilität
- -) geringe Toxizität
- -) geringe Metabolisierung durch die Zelle
- -) Reaktion muß im Zellmilieu ablaufen können

Aus der Bedeutung, die ein intakter Glutathionzyklus für jede Zelle besitzt und aus der Tatsache, daß sich der Glutathionstoffwechsel immer mehr als 'target' in der Tumortherapie erweist **(46),(47),(48)**, ergibt sich die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit: Es soll eine durchflußcytometrische Meßmethode für reduziertes Glutathion in intakten Zellen entwickelt werden und ihre Anwendbarkeit am Beispiel von Tumorzellen und nicht-malignen Zellen untersucht werden. Die Fragestellung beinhaltet im wesentlichen drei Punkte:

a) Auswahl einer geeigneten Substanz
b) Austesten von Spezifität und Störfaktoren
c) Anwendung in der Durchflußcytometrie

Es wird auf folgende Weise vorgegangen: Nach der fluorimetrischen Charakterisierung der Farbstoff-Substrat-Reaktion werden HPLC-Analysen durchgeführt, um die Verteilung des Farbstoffs in ganzen, intakten Zellen zu untersuchen. Mit dem Durchflußcytometer werden die durch gängige Thiolblocker und Glutathion-Oxidantien verursachten Störungen des Glutathionstatus in ihren Auswirkungen auf die Färbung gemessen und korreliert. Abgeschlossen werden die Versuche mit einem Vergleich der verschiedenen Farbstoffe, sowie mit Untersuchungen über zelltyp-spezifische Unterschiede in der Reaktion auf oxidativen Streß.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

ADB	Paesel (Frankfurt)
BCNU	Bristol (Bergisch Gladbach)
BSA	Sigma (München)
CuOOH	Sigma (München)
DCH	Ega-Chemie (Steinheim)
DEM	Sigma (München)
Diamide	Sigma (München)
Dispase	Böhringer (Mannheim)
DMF	Baker (Deventer, NL)
DTNB	Sigma (München)
EDTA	Merck (Darmstadt)
FCS "HY-Clone"	Paesel (Frankfurt)
FITC	Sigma (München)
Folin-Reagenz	Merck (Darmstadt)
GSH	Sigma (München)
GSSG	Sigma (München)
GSSG-Reduktase	Sigma (München)
H_2O_2	Merck (Darmstadt)
HEPES	Serva (Heidelberg)
$HgCl_2$	Merck (Darmstadt)
MOPS	Sigma (München)
NADPH	Sigma (München)
NEM	Sigma (München)
OPT	Sigma (München)
PCMS	Sigma (München)
PI	Sigma (München)
RPMI	Gibco (Paisley, UK)
SDS	Serva (Heidelberg)
tbuOOH	Sigma (München)
Thiolyte MB,DB,MQ	Calbiochem (Frankfurt)
TRIS	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Trypsin PM14	Serva (Heidelberg)
$ZnCl_2$	Merck (Darmstadt)

Freundlicherweise wurde zur Verfügung gestellt:
BSO, HeCCNU, CCNU, MeCCNU von W.Stahl, Univ. Kaiserslautern
PZ51 von Prof. A.Wendel, Univ. Tübingen.

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, als p.A.-Substanzen bezogen. Für alle Versuche wird doppelt quarz-destilliertes Wasser verwendet.

2.2. Pufferlösungen

HBS: 5 mM HEPES / NaOH , pH 7.4
0.95 % (G/V) NaCl
300 mOsm., 15 mSiemens/ 22 °C

TBS: 10 mM TRIS / HCl , pH 7.1
0.95 % (G/V) NaCl
300 mOsm., 16.2 mSiemens/ 22 °C

Phosphatpuffer (50mM/100mM) mit verschiedenen pH-Werten werden durch Mischen äquimolarer Lösungen von Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 hergestellt.

2.3. Zellkulturen

2.3.1. Medium, Lösungen

RPMI 1640 (25 mM HEPES), fertiges Flüssigmedium mit 10% FCS.
Trypsinierlösung: Trypsin 0.03% (G/V, entsp. 0.5 U/mg) in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} mit 10 g/l Glucose.
Dispaselösung: Dispase aus Bacillus polymyxa, Reinheitsgrad II, 0.5 U/mg (Boehringer, Mannheim), 1.25 U/ml in TBS.

2.3.2. Durchführung

Einsäen der Zellen ($5x10^5$) als Einzelzellsuspension in Kulturflaschen (75 ml-Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) mit 25 ml RPMI + 10% FCS. Inkubation im Brutschrank bei

37°C, in Luft mit 5% CO_2, 85% rel. Feuchte. Zellernte geschieht nach 7-10 Tagen durch Zentrifugation (200xg) und Wiederaufnahme der Zellen in frisches Medium. Vitalitätsbestimmung wird mittels Trypanblauausschluß durchgeführt; dazu wird ein Aliquot Zellsuspension mit gleichem Volumen Trypanblaulösung (9mg/ml TBS) versetzt und die Zahl der lebenden, ungefärbten Zellen in einer Neubauer-Türck-Zählkammer nach 15 min. Inkubation bei RT bestimmt.
Zellen vom Tumor R3230AC wachsen in der Kultur als adhärenter Zellrasen. Hier ist zum Überimpfen regelmäßig Trypsinierung nötig (s.2.5.1.).

2.3.3. Cytostatischer Ansatz

Der Ansatz stellt eine Kurzzeit-Inkubation von Zellmaterial mit verschiedenen Chemotherapeutika dar.
In Titerplatten (Costar Typ 3524) werden steril je 2 ml Inkubationsmedium (RPMI + 10% (V/V) FCS) gefüllt und etwa 100 µl Einzelzellsuspension (10^7 Zellen) hinzugefügt. Die zu testenden Therapeutika werden in einer Konzentration hinzupipettiert, die in etwa einer klinischen Anwendung entspricht (a); zusätzlich werden das 10-fache (b) und 0.1-fache (c) dieser Konzentration eingesetzt. Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C in Luft mit 5% CO_2 für 6-48 Stunden. Anschließend werden die Zellen zweimal in HBS gewaschen (200xg) und in etwas HBS resuspendiert. Die Untersuchung des Zellmaterials erfolgt nach spezifischer Färbung mit Hilfe der Durchflußcytometrie.

2.4. In vivo Tumorhaltung

2.4.1. Versuchstiere

Ratten: Für den Tumor R3230AC und zur Präparation von Knochenmarkszellen werden weibliche syngene Fischer 344 Ratten (Gewicht 180-220 g) von Fa. Charles River Wiga (Sulzfeld) bezogen.

Mäuse: Zur Passage des Tumors Ehrlich Ascites EA2P8 werden weibliche syngene C57bl Mäuse verwendet (Eigenzüchtung), ebenso für die Passage des Lewis Lung Tumors.
Die Tierhaltung erfolgt in Makrolon-Käfigen bei 20°C, 55% rel. Feuchte, Nahrung: Altromin Standard (Altrogge, Lage), Leitungswasser ad libitum.

2.4.2. R3230AC Tumor Passage

Der R3230 Tumor ist ein spontan in Fischer 344 Ratten entstandenes Mamma-Adenocarcinom **(49)**. Die hier verwendete Zellinie wurde freundlicherweise von Dr. Harthus, Behringwerke, Marburg, zur Verfügung gestellt.
Zur Transplantation wird der etwa kirschgroße Tumor dem Spendertier steril entfernt, ein 5x5 mm großes Tumorfragment herauspräpariert und unter Äthernarkose einer Ratte s.c. implantiert.

2.4.3. Lewis Lung Tumor Passage

Der Lewis Lung Tumor ist ein undifferenziertes Carcinom, was im Spätstadium neben dem Primärtumor ausgeprägte Metastasenbildung in der Lunge zeigt. Das hier verwendete Inoculum wurde freundlicherweise von Dr. Lersch, Institut für chirug. Forschung, München, zur Verfügung gestellt.
Zur Tumortransplantation wird der Primärtumor dem durch Äthernarkose getöteten Tier steril entnommen und mittels Mörser und Pistill unter Zugabe von sterilem TBS zu einer injizierbaren Tumorsuspension verrieben, wovon 0.2 ml in den Oberschenkel einer Maus i.m. injiziert werden.

2.4.4. Ehrlich Ascites Tumor Passage

Der Tumor wächst als Peritoneal Carcinom und besitzt den Vorteil, daß bei seiner Verwendung keinerlei Maßnahmen zur Zellvereinzelung benötigt werden. Das verwendete Inoculum (Stamm EA2P8) stellte freundlicherweise Dr.v.d.Mark, MPI für

Biochemie, Martinsried, zur Verfügung.
Dem in Äthernarkose getöteten Tier wird der Tumor durch Punktieren der Bauchhöhle steril entnommen. Nach Animpfen von 0.4 ml Ascites-Punctat werden 8-10 Tage bis zum erneuten Überimpfen benötigt.

2.5. Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

Für die Durchflußcytometrie werden Einzelzellen benötigt; diese werden durch mechanische oder enzymatische Methoden aus dem Gewebeverband herausgelöst.

2.5.1. Aus der Zellkultur

R3230AC Zellen werden in Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz inkubiert. Dann erfolgt Dekantieren des Mediums und Inkubation mit 10 ml Trypsinierlösung bei 37°C. Nach 15 Minuten wird die Trypsinierung durch Zugabe von 1 ml FCS beendet und durch zweimaliges Waschen der Zellen in HBS (Zentrifugation 200xg) abgeschlossen.

2.5.2. Aus soliden Tumoren

Der Tumor wird dem durch Äthernarkose getöteten Tier steril entnommen, von nekrotischem Material befreit und entweder mit einer Gewebepresse oder einem motorgetriebenen Hackmesser mechanisch zerkleinert. Die Fragmente werden mit HBS gewaschen und in einem Trypsiniergefäß mit 5 ml Trypsin (0.03% in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} mit 10g/l Glucose) oder 5ml Dispaselösung (1.5 U/ml TBS mit 10g/l Glucose) bei 37°C 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml FCS erfolgt Filtration durch Mullgaze und zweimaliges Waschen der Zellen mit HBS durch Zentrifugation (200xg).

2.6. GSH-Bestimmungen an Zellhomogenaten

2.6.1. Aufarbeitung des Zellmaterials (nach (50)).

Von der zu messenden Zellsuspension wird ein Aliquot zur Proteinbestimmung entnommen. Der verbleibende Rest wird mit dem gleichen Volumen einer eiskalten 2 M Perchlorsäure (4 mM EDTA) versetzt und 15 Minuten in Eis gelagert. Nach Abzentrifugation des ausfallenden Proteins erfolgt vorsichtiges Neutralisieren des Überstands mit 2 M KOH (0.3 M MOPS) und erneutes Abzentrifugieren. Der Überstand enthält das zu bestimmende Glutathion.

2.6.2. GSH-Bestimmung mit OPT (nach (51)).

Diese Methode beruht auf der Umsetzung von GSH mit OPT zu einem fluoreszenten Addukt und erfaßt nur reduziertes Glutathion.

Ansatz:

3 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0
+ 50 µl Probe (Überstand aus 2.6.1.)

---

5 Minuten bei RT inkubieren, im Fluorimeter Background bestimmen.

---

50 µl OPT (3 mg/ml in EtOH) hinzugeben und nach 30 Minuten Fluoreszenz ablesen, Background abziehen. Excitation 338 nM, Emission 420 nm.

Anhand einer Eichgerade kann die Absolutkonzentration bestimmt werden, die aber zum Vergleich der Zellen untereinander nicht benötigt wird.

2.6.3. GSH-Bestimmung mit DTNB (nach (52)).

Diese Methode erfaßt reduziertes und oxidiertes Glutathion.

Ansatz:

1 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0 (1 mM EDTA)
+ 100 µl Probe (Überstand aus 2.6.1.)
+ 50 µl NADPH Lösung (4mg/ml in 0.5% $NaHCO_3$)
+ 20 µl DTNB Lösung (1.5mg/ml in 0.5% $NaHCO_3$)
+ 20 µl GSSG-Reduktase (6U/ml)

Gut mischen, dann die Abnahme der Extinktion E_{412nm} messen.

2.6.4. Proteinbestimmung (nach (53)).

Proteinbestimmungen werden durchgeführt, um die GSH-Messungen standardisieren und vergleichen zu können.

Stammlösungen:

Lösung A: 1% (G/V) Kupfersulfat in H_2O
Lösung B: 2% (G/V) Natriumtartrat in H_2O
Lösung C: 2% (G/V) Natriumcarbonat in 0.1N NaOH
Protein Eichlösung: 1mg/ml BSA in H_2O

Vorbereitung:

1 ml Lösung A	Gut mischen, frisch
+ 1 ml Lösung B	ansetzen, ergibt die
+ 98 ml Lösung C	Meßlösung.

Ansatz:

1.2 ml Probe bzw. Eichlösung
+ 6.0 ml Meßlösung

---

sofort mischen, 10 Minuten bei RT stehenlassen

+ 0.3 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

---

sofort mischen, 30 Minuten bei RT stehenlassen

Extinktion E_{500nm} gegen Leerwert messen
und eine Eichgerade erstellen.

2.7. HPLC

HPLC-Trennungen der Lysate von gefärbten Zellen liefern eine Aussage über die intracelluläre Lokalisation des Farbstoffs und die Fluoreszenzeigenschaften des gefärbten Moleküls.

2.7.1. HPLC-Aufbau

Es werden Gelsieb-Säulen Ultropak TSK-G 3000SW (analytisch, Totvolumen 27 ml) bzw. TSK-G 3000SWG (präparativ, Totvolumen 218 ml) von LKB (Bromma, Schweden) verwendet in Kombination mit Pumpe 2150 (LKB) und dem UV-Monitor 2238 (LKB) zur Proteindetektion. Der Anschluß an eine 25 µl Durchflußküvette (Hellma, Freiburg), die sich in einem Fluoreszenzspektrometer (s.2.8.1.) befindet, ermöglicht gleichzeitige Messung der Proteinkonzentration und Fluoreszenzeigenschaften des Eluats. Die Datenübertragung erfolgt online auf einen VAX 11/780 Rechner.- Zum Auftrag der Probe dienen Rheodyne Schleifen mit 100 µl bzw. 2 ml Volumen.

2.7.2. HPLC-Laufpuffer

Zur vollständigen Lyse und Proteinsolubilisierung wird das Detergenz SDS verwendet. Da SDS in höheren Konzentrationen mit Phosphatpuffern ausfällt, wird auf Tris- oder Hepes-Puffer zurückgegriffen.

A: 50 mM Tris/HCl pH 7.2
2 mM EDTA
0.5% (W/V) SDS (optional)

B: 50 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 7.2
2 mM EDTA

C: 0.1 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 7.2

Die Laufpuffer werden vor und während der Trennung ausgiebig mit Helium begast.

2.7.3. Analytische HPLC-Trennung

Die mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Zellen werden in HBS gewaschen und zentrifugiert. Lyse des Zellpellets geschieht durch 0.5 ml Puffer A (+ 0.5% SDS) und zusätzliche Ultraschallbehandlung (MSE 7100, 100W, Microtip, 15 Sekunden; Vertrieb: Colora, Lorch). Das Zell-Lysat wird per Millipore Filter (0.45 µm) filtriert und zur Trennung aufgetragen. Flußraten: 0.8 ml/min für TSK-G3000SW, 3.0 ml/min für TSK-G3000SWG. Wellenlängen zur Detektion des fluoreszenten Eluats:

Farbstoff	Excitation	Emission
OPT	338 nm	420 nm
MB	388 nm	480 nm

In den Fällen, wo ausschließlich Ultraschall zur Lyse benutzt wird, entfällt die Zugabe von SDS zum Laufpuffer, wodurch sich das Trennvermögen verbessert. Um die Messungen miteinander zu vergleichen, wird auf den höchsten Protein-Peak standardisiert und die Fluoreszenzintensität rechnerisch mit dem entsprechenden Faktor gewichtet.

2.7.4. Präparative HPLC-Trennung

Die präparative HPLC wird durchgeführt, um mit der folgenden Dünnschichtchromatografie (DC) die Formation von intracellulären OPT-GSH-Addukten zu bestätigen.
Durchführung wie in 2.7.3. beschrieben, aber unter Verwendung von Laufpuffer C. Nach ihrer Fluoreszenz werden sieben Fraktionen aus dem Eluat gepoolt, lyophilisiert und für die DC verwendet. Als Referenz dient ein äquimolarer Komplex aus GSH und OPT.

2.7.5. Dünnschichtchromatografie

Die Dünnschichtchromatografie wird zum Nachweis durchgeführt, daß in OPT-gefärbten Zellen tatsächlich OPT-GSH entsteht.
Auf einer Kieselgel 60 DC-Platte ohne FI (Merck, Darmstadt) werden wiederholt 2 µl der HPLC-Fraktionen (aus 2.7.4.) aufgetragen. Als Referenz dient eine Verdünnungsreihe, die aus einem äquimolaren GSH-OPT-Komplex erstellt wird.

Laufmittel: 27 ml Ethanol abs.
9 ml H_2O
60 µl 0.1 N NaOH (2% Na_2CO_3)

Nachweis der fluoreszenten Banden durch UV-Auflicht (366 nm), Nachweis der Proteinfraktion durch Ninhydrin-Spray (Merck, Darmstadt).

2.8. Fluoreszenzspektroskopie

Verwendet wird ein prozessorgesteuertes Fluoreszenzspektrometer LS-5 (Perkin-Elmer, Bodenseewerk, Überlingen) mit interner Rhodamin-Referenz und temperierbarer Küvettenhalterung. Das Gerät besitzt eine online-Kopplung an einen VAX 11/782 Rechner, der Steuerung, Datentransfer und Auswertung über Fortranprogramme (Dr.H.Horst, MPI Biochemie) übernimmt. Spektren (Excitation, Emission) und Kinetiken der Fluoreszenzfarbstoffe werden in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke aufgenommen. Für kleine Volumina findet eine 25 µl Durchflußküvette Verwendung.

2.9. Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchungen werden an einem Leitz Fluoreszenzmikroskop (150W Xenonlampe) durchgeführt. Anregungsfilter: 300-400 nm. Emissionsfilter: 400-700 nm. Das Filmmaterial ist KODAK Ektachrome (160 Kunstlicht, EPT135-36; ISO 160).

2.10. Durchflußcytometrie

2.10.1. Ausrüstung

Verwendet wird ein "Fluvo-Metricell-Durchflußcytometer" **(54)** mit einer 100 Watt Quecksilberhochdrucklampe (HBO-100, Osram) als Anregungslichtquelle und einem "Cytomic 12" zur online-Zweiparameter-Analyse. Zur Aufnahme der Primärdaten dienen ein "Interdata"-Rechner mit Festplatte und Magnetbandstation.

2.10.2. Meßprinzip

Mit dem hier verwendeten Gerät ist bei einer Meßrate von 500-1000 Zellen/sec die simultane Messung des Volumenwerts und zweier Fluoreszenzen möglich. Wichtigstes Teil ist die Meßkammer, die aus einer Vor- und einer Hauptkammer besteht; beide sind durch die eigentliche Meßöffnung miteinander verbunden **(Abb.2.1.)**. Die Meßkammer ist mit HBS gefüllt und wird durch den den Sog einer Pumpe ständig mit HBS gespült. Kurz vor der Meßöffnung endet eine dünne Glaskapillare, über die die Zellen zugeführt werden. Durch die Elektroden in Vor- und Hauptkammer fließt ein Konstantstrom von 0.229 mA. Tritt eine Zelle durch die Meßöffnung von der Vor- in die Hauptkammer, so wird dieses Ereignis als Verringerung der Leitfähigkeit von der Elektronik registriert (Coulterprinzip). Die Höhe der Änderung ist proportional dem Volumen der Zelle. Gleichzeitig ist das Licht einer Quecksilberhochdrucklampe über ein Mikroskopobjekt (100x, Neofluar, Zeiss, Oberkochem) auf die Meßöffnung fokussiert. Das von den Zellen emittierte Fluoreszenzlicht wird durch dichroitische Spiegel vom Anregungslicht abgetrennt, durch weitere Spiegel in zwei Fluoreszenzlicht-Kanäle aufgespalten und letztlich auf zwei Photoröhren gelenkt. Durch geeignete Wahl der Dichroitspiegel und optischen Filter kann praktisch jeder Fluoreszenzfarbstoff gemessen werden, auch Doppelfärbungen sind möglich **(Abb.2.2.)**.

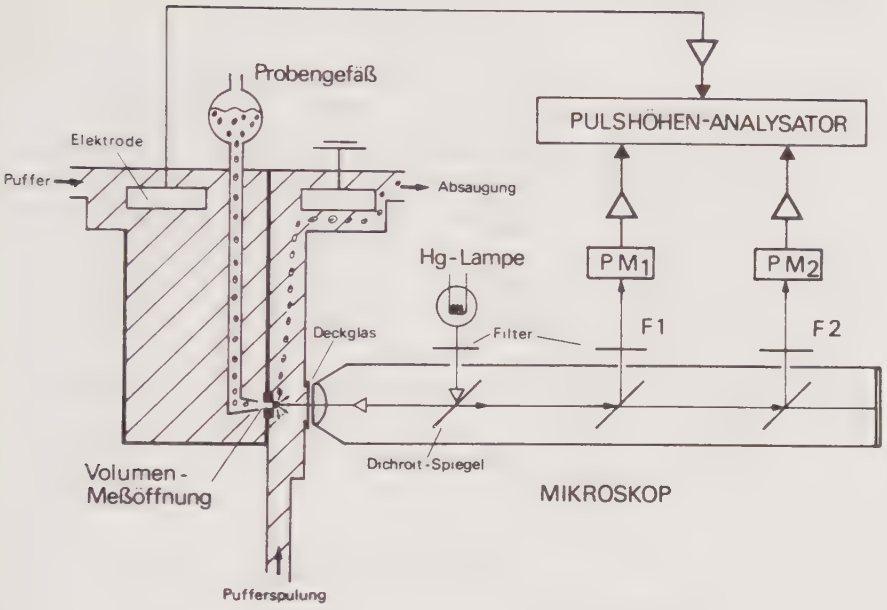


Abb.2.1. Schema des Fluvo-Metricell-Durchflußcytometers (PM 1/2 = Photoröhren, F1 = Fluoreszenzlichtkanal 1, F2 = Fluoreszenzlichtkanal 2).

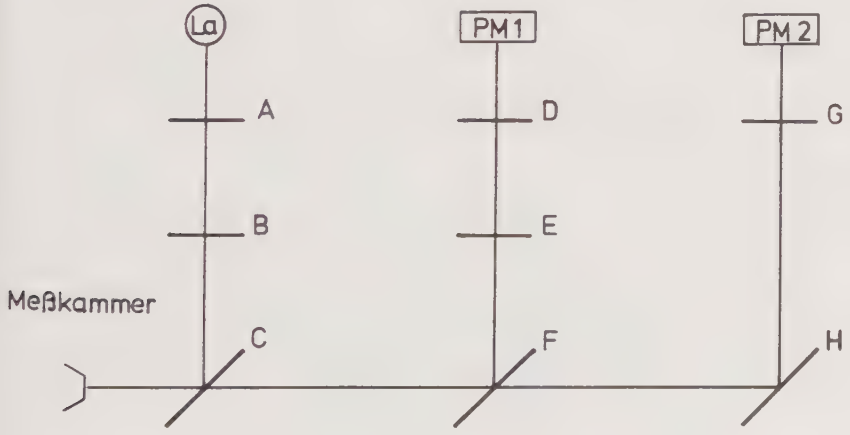


Abb.2.2. Anordnung der optischen Filter im Durchflußcytometer.

Tabelle zu Abb.2.2.:

	Färbung:			
Filter	ADB/PI	Bromobimane	OPT	OPT/PI
A	BP 315-640	BP 315-640	BP 315-640	BP 315-640
B	BP 300-400	BP 300-400	BP 300-400	BP 300-400
C	DI 420	DI 420	DI 400	DI 420
D	LP 418	LP 418	LP 388	LP 388
E	KP 440	--	KP 440	KP 440
F	DI 460	DI 460	DI 420	DI 530
G	LP 500	LP 500	LP 450	LP 590
H	HPL	HPL	HPL	HPL

(LP = Langpaß, KP = Kurzpaß, BP = Bandpaß, DI = Dichroit, HPL = Spiegel).

2.10.3. Datenverarbeitung

Volumen- und Fluoreszenzwerte jeder einzelnen Zelle werden mit einer Auflösung von 7 Bit (128 Klassen) je Parameter gemessen und auf Magnetband gespeichert (55). Die Auswertung der Daten erfolgt mit einem Satz von Programmen (Prof. Valet, Martinsried), die mehrere Möglichkeiten zur Darstellung bieten: entweder als 32x32x32 Klassen umfassendes Dreiparameterhistogramm ("Würfel") oder in reduzierter Form als Zweiparameterhistogramme mit 64x64 Klassen; hieraus kann durch Projektion auf eine der beiden Achsen ein Häufigkeitshistogramm erstellt werden. Mit diesen Mitteln ist eine exakte Bestimmung von Zellzahl, Volumen, Fluoreszenzintensität und Farbstoffkonzentration sofort möglich; aber auch Mittelwerte mitsamt Statistik können für beliebige Zellpopulationen errechnet werden. Als Rechner dient ein VAX 11/782 Computer (DEC, Massachusetts) mit Plotter und Drucker.

2.10.4. Eichpartikel

Um Volumen- und Fluoreszenzmessungen reproduzierbar zu machen, werden fluoreszente, monodisperse Eichpartikel benötigt. Die Partikel werden dem Färbeansatz als interne Referenz zugegeben.
Monodisperse Latexpartikel (NH_2-substituiert, Durchmesser 4.88 µm, Volumen-V_k 0.8-2%) wurden freundlicherweise von Prof. Ugelstad, Univ. Trondheim (Norwegen) zur Verfügung gestellt. Herstellung fluoreszenter Partikel erfolgt durch Inkubation in einer FITC-Lösung (1mM, $NaHCO_3$-Puffer pH 9.5). Für Messungen im blauen Emissionsbereich werden DCH-gefärbte Partikel verwendet (20 µg/ml in TBS).

2.10.5. ADB/PI-Färbung (nach (56)).

Die durchflußcytometrische Messung von Zellen nach simultaner Färbung mit ADB und PI **(Abb.2.3.A/B)** liefert gleichzeitig eine Aussage über die intracelluläre Esteraseaktivität und den intracellulären pH der lebenden Zellen, sowie über Zahl und Zellzyklusstand der toten Zellen einer Zellpräparation.

Färbecocktail: 1 mg/ml ADB
2 mg/ml PI gelöst in DMF.

Ansatz:
250 µl HBS
50 µl Zellsuspension
5 µl Färbecocktail
---
5 Minuten bei RT inkubieren

Messung im Durchflußcytometer
Filtersatz A, s. Abb.2.2.

2.10.6. Thiolyte-(Bromobimane)-Färbung.

Bromobimane reagieren mit jeder frei zugänglichen, reduzierten Thiolgruppe **(57)**. Es werden membranpermeable (MB, DB) und impermeable (MQ) Bimane verwendet **(Abb.2.3.C)**.

Färbelösung: 10 mM Bromobimane in DMF

Ansatz:
450 µl HBS
50 µl Zellsuspension
5 µl Färbelösung
---
4 Minuten bei RT inkubieren
---
10 µl PI (2 mg/ml in HBS)
---
1 Minute bei RT inkubieren;
Messung im Durchflußcytometer
Filtersatz B, s. Abb.2.2.

2.10.7. OPT-Färbung

OPT **(Abb.2.3.D)** reagiert intracellulär mit GSH unter Bildung fluoreszenter Addukte **(58)**.

Färbelösung: 50 mM OPT in DMF

Ansatz:
450 µl HBS
50 µl Zellsuspension
5 µl Färbelösung
---
5 Minuten bei RT inkubieren;
Messung im Durchflußcytometer
Filtersatz C, s. Abb.2.2.

2.10.8. OPT/PI-Färbung

Färbelösung: 50 mM OPT in DMF

Ansatz:
450 µl HBS
50 µl Zellsuspension
5 µl Färbelösung
---
5 Minuten bei RT inkubieren
---
10 µl PI (2 mg/ml in HBS)
---
1 Minute bei RT inkubieren;
Messung im Durchflußcytometer
Filtersatz D, s. Abb.2.2.

Da die Entwicklung dieser Färbung Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, wurden mehrere Variationen bezüglich der Konzentration, Färbezeit, Filter und Einstellung vorgenommen.

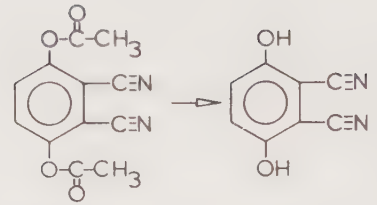


Abb.2.3.A 1,4-Acetoxy-2,3-dicyanobenzol (**ADB**). Aus der membranpermeablen Substanz setzen intracelluläre Esterasen fluoreszentes Dicyanohydrochinon (**DCH**) frei, dessen Emissionscharakteristik abhängt vom Dissoziationsgrad (und damit vom pH) der Hydroxygruppen.

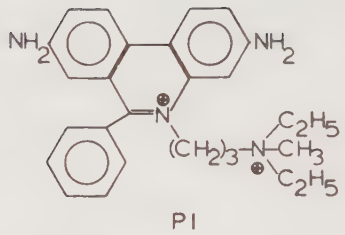


Abb.2.3.B Propidiumjodid (**PI**). Intercaliert in DNA unter Ausbildung fluoreszenter Addukte, jedoch kann das Molekül wegen seiner Ladung intakte Zellmembranen nicht permeieren.

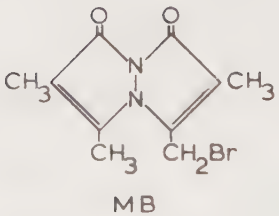


Abb.2.3.C Monobrombimane (**MB**). Nichtfluoreszente, membrangängige Substanz, die nach Reaktion mit Thiolgruppen fluoreszente Thioether bildet (57).

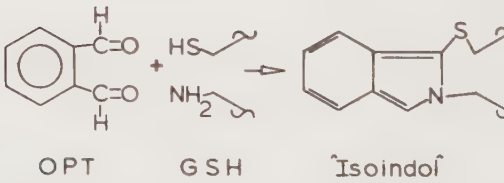


Abb.2.3.D Ortho-Phthaldialdehyd (**OPT**). Membrangängige, nichtfluoreszente Substanz, deren Aldehydfunktionen sich mit Aminogruppen zur Schiffschen Base bzw. mit Thiolgruppen zum Thiohemimercaptal umsetzen können. Im Fall der Reaktion mit GSH ist Umlagerung zum fluoreszenten Isoindolderivat wahrscheinlich (80).

3. ERGEBNISSE

3.1. Fluorimeter

3.1.1. Reaktion von OPT mit GSH

In HBS gelöst besitzen beide Reaktanden keine Eigenfluoreszenz, setzen sich jedoch zu einem Addukt mit intensiver Blaufluoreszenz um **(Abb.3.1.1.)**. Optimale Parameter sind 338 nm für die Excitation und 420 nm für die Emission.

3.1.2. Reaktion von MB mit GSH

In HBS reagiert MB mit GSH unter Ausbildung einer türkisfarbenen Fluoreszenz **(Abb.3.1.2.A)**. Maximale Excitation: 388 nm, Emission: 480 nm. Im Vergleich zum OPT fällt die deutlich höhere Eigenfluoreszenz des MB auf, die auch in Abwesenheit von Thiolen zu beobachten ist und ihre Ursache in einer Hydrolyse der Substanz in wäßrigen Lösungsmitteln hat, siehe 3.1.9.
Beim Vergleich von äquimolaren Komplexen aus OPT-GSH und MB-GSH entwickelt GSH mit OPT eine um den Faktor 3 höhere Fluoreszenzausbeute **(Abb.3.1.2.B)**.

3.1.3. OPT-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der GSH-Konzentration

Bei Vorlage einer 0.1 mM OPT-Lösung und Titration mit verd. GSH-Lösungen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und GSH-Konzentration im Bereich von 1 nM bis über 45 µM GSH **(Abb 3.1.3.)**.

3.1.4. Einfluß von Thiolblockern auf die Reaktion mit GSH

Ein geringer, molarer Überschuß von Quecksilberchlorid inhibiert die Reaktion von GSH mit OPT und MB vollständig **(Abb.3.1.4.)**. Im Fall von MB bleibt aber auch bei höherer

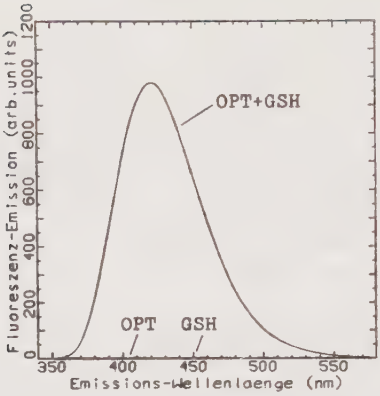


Abb.3.1.1. Emissionsspektrum eines OPT-GSH-Komplexes (10 µM) in HBS im Vergleich zu den nicht-fluoreszenten Einzelkomponenten. Excitation 338 nm.

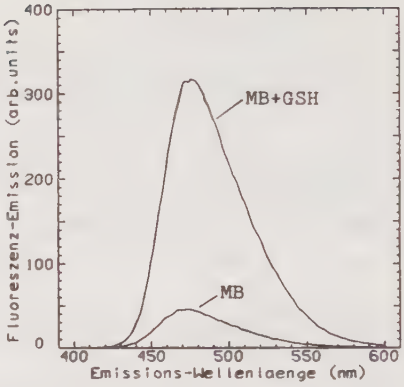


Abb.3.1.2.A. Emissionsspektrum eines MB-GSH-Komplexes (10 µM) in HBS. Auch ohne Thiol ist MB deutlich fluoreszent (Hydrolyse). Excitation 388 nm.

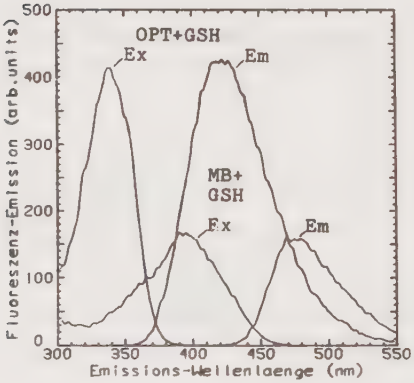


Abb.3.1.2.B. Spektrale Charakterisierung von OPT bzw. MB nach Reaktion mit GSH. OPT weist dreifach höhere Fluoreszenzausbeute auf. (Ex=Excitations-/ Em=Emissionsspektrum).

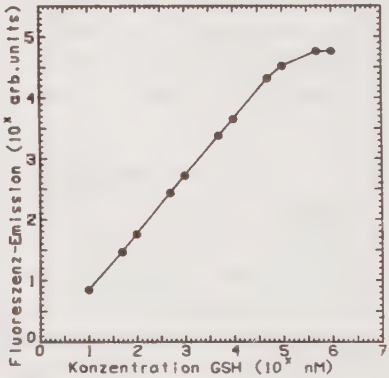


Abb.3.1.3. OPT (0.1 mM in 100 mM NaPP-Puffer, pH 7.4) zeigt lineare Zunahme der Fluoreszenz mit steigender GSH-Konzentration (1 nM - 45 µM).

$HgCl_2$ Konzentration eine Restfluoreszenz, die somit einen Fehler in der Thiolmessung verursacht.
Gleiche Ergebnisse werden bei Verwendung von NEM und PCMS erhalten. - Spätere Zugabe des Thiolblockers nach erfolgter Reaktion zwischen GSH und OPT oder MB hat keinen Einfluß auf die Fluoreszenz.

3.1.5. Reaktion von OPT mit Aminosäuren

Im Vergleich zu GSH entwickeln die getesteten Aminosäuren mit OPT keine nennenswerte Fluoreszenz mit Ausnahme von Histidin. Hier wird zu Beginn der Reaktion ein Fluoreszenzmaximum erreicht, dessen Intensität dann auch unter Lichtabschluß permanent abnimmt. Nach 10 Minuten Inkubationsdauer ist ein Rückgang der Fluoreszenz auf etwa 17% der entsprechenden GSH-OPT-Fluoreszenz zu beobachten. Dieser Effekt tritt sowohl in Hepes- als auch in Tris-Puffer auf. Gemessene Fluoreszenzintensitäten:

GSH	100.0%	Cys	0.0%	CySS	0.0%
Gly	0.0%	Met	0.0%	His	17.0%
Tyr	0.0%	Leu	0.0%	Arg	0.0%
Asn	0.0%	Phe	0.0%	Glu	0.0%
Thr	0.0%	Ser	0.0%	Trp	0.0%
Asp	0.0%				

Ansatz: 3ml Hepes-Puffer (50 mM, pH 7.4)
+ 15µl 10 mM Aminosäure
+ 15µl 100 mM OPT in DMF

In Gegenwart von Formaldehyd (FA) wird die Reaktion von Histidin mit OPT abgeschwächt, während GSH unbeeinflußt bleibt. Andererseits inhibiert Anwesenheit von Quecksilber (HG) die Reaktion von GSH mit OPT vollständig, nicht jedoch mit Histidin. Es ergeben sich folgende Fluoreszenzintensitäten:

GSH + OPT:	100.0%	Histidin + OPT:	16.3%
GSH + FA + OPT:	100.6%	Histidin + FA + OPT:	8.7%
GSH + HG + OPT:	0.0%	Histidin + HG + OPT:	15.2%

Ansatz: 3ml Hepes-Puffer (50 mM, pH 7.4)
+ 15µl 10mM GSH bzw. Histidin
+ 15µl 15mM FA / HG
+ 15µl 100mM OPT in DMF

Weiterhin weist das aus der Reaktion von OPT mit Histidin erhaltene Addukt im Fluoreszenzspektrum mit 438 nm ein längerwelliges Emissionsmaximum auf als das von OPT und GSH (420 nm).

3.1.6. Reaktion von OPT mit GSH in Gegenwart von Aminosäuren

Gleichzeitige Anwesenheit von Aminosäuren beeinflußt die Reaktion von GSH mit OPT erst dann, wenn die Konzentration der Aminosäuren im gleichen Bereich liegt, wie das zu bestimmende GSH; die Intensität der Störung hängt von der Art der Aminosäure (AS) ab **(Tabelle 3.1.6.)**.

3.1.7. Reaktion von MB mit Aminosäuren

MB reagiert spezifisch mit der Thiolgruppe von Aminosäuren. Es wird aber auch ohne Thiol eine ausgeprägte Fluoreszenz gemessen, die auf Spontanhydrolyse beruht (siehe 3.1.9.). Gemessene Fluoreszenzintensitäten:

GSH	100.0%	Cys	96.1%	CySS	18.8%
Gly	18.5%	Met	19.1%	His	18.8%
Tyr	19.4%	Leu	18.3%	Arg	18.3%
Asn	18.2%	Phe	18.9%	Glu	18.3%
Thr	18.6%	Ser	20.5%	Trp	18.6%
Asp	19.1%	MB	18.3%		

Konz. GSH	Konz. AS	Konz. OPT	Fluoreszenz
50 µM	-	500 µM	100.0%
50 µM	5 µM His	500 µM	99.3%
50 µM	5 µM Gly	500 µM	101.3%
50 µM	5 µM Ser	500 µM	100.1%
50 µM	5 µM Arg	500 µM	98.7%
50 µM	5 µM Cys	500 µM	97.8%

Konz. GSH	Konz. AS	Konz. OPT	Fluoreszenz
50 µM	-	62.5 µM	100.0%
50 µM	5 µM His	62.5 µM	105.9%
50 µM	5 µM Gly	62.5 µM	97.4%
50 µM	5 µM Ser	62.5 µM	96.6%
50 µM	5 µM Arg	62.5 µM	84.7%
50 µM	5 µM Cys	62.5 µM	93.2%

Konz. GSH	Konz. AS	Konz. OPT	Fluoreszenz
50 µM	-	500 µM	100.0%
50 µM	50 µM His	500 µM	96.7%
50 µM	50 µM Gly	500 µM	68.3%
50 µM	50 µM Ser	500 µM	88.0%
50 µM	50 µM Arg	500 µM	81.6%
50 µM	50 µM Cys	500 µM	83.5%

Konz. GSH	Konz. AS	Konz. OPT	Fluoreszenz
50 µM	-	62.5 µM	100.0%
50 µM	50 µM His	62.5 µM	116.3%
50 µM	50 µM Gly	62.5 µM	95.7%
50 µM	50 µM Ser	62.5 µM	99.1%
50 µM	50 µM Arg	62.5 µM	100.0%
50 µM	50 µM Cys	62.5 µM	87.2%

Konz. GSH	Konz. AS	Konz. OPT	Fluoreszenz
50 µM	-	500 µM	100.0%
50 µM	150 µM His	500 µM	80.1%
50 µM	150 µM Gly	500 µM	55.9%
50 µM	150 µM Ser	500 µM	71.3%
50 µM	150 µM Arg	500 µM	59.8%
50 µM	150 µM Cys	500 µM	63.6%

Konz. GSH	Konz. AS	Konz. OPT	Fluoreszenz
50 µM	-	62.5 µM	100.0%
50 µM	150 µM His	62.5 µM	129.8%
50 µM	150 µM Gly	62.5 µM	94.9%
50 µM	150 µM Ser	62.5 µM	113.5%
50 µM	150 µM Arg	62.5 µM	72.0%
50 µM	150 µM Cys	62.5 µM	66.1%

Tabelle 3.1.6.: Einfluß von Aminosäuren (AS) auf die Umsetzung von OPT mit GSH.

Ansatz: 3ml Hepes-Puffer (50 mM, pH 7.4) + 5µl 1mM Aminosäure + 5µl 2mM MB in DMF

3.1.8. Reaktion von OPT mit Proteinen

Auch an Proteine kann OPT unter Bildung fluoreszenter Addukte binden: **Abb.3.1.8.A** zeigt die Emissionsspektren äquimolarer Komplexe aus diversen Proteinen und OPT, ein GSH-OPT-Addukt dient als Referenz. Mit Ausnahme der Meerrettich-Peroxidase weisen alle Proteinkomplexe ein kürzerwelliges Maximum als der entsprechende GSH-Komplex auf.
Wird die zu untersuchende Substanz (BSA bzw. GSH) zuvor mit Quecksilberchlorid versetzt und dann in äquimolarer Konzentration mit OPT gefärbt, so zeigt sich ein grundlegender Unterschied: während die Reaktion von OPT mit GSH vollständig inhibiert ist, so wird die Bindung von OPT an BSA durch den Thiolblocker nur wenig beeinflußt **(Abb.3.1.8.B)**.
Noch auffälliger werden die Unterschiede zwischen Protein und GSH, wenn OPT in einem 100-fach molaren Überschuß eingesetzt wird **(Abb.3.1.8.C)**. Die Fluoreszenzintensität des BSA-OPT-Komplexes steigt dabei deutlich über die des entsprechenden GSH-OPT-Addukts, was auf das Vorhandensein mehrerer Bindungsorte für OPT am Protein hinweist. Charakteristisch für diese Bindung ist auch hier die nur moderate Inhibierung durch Thiolblocker. Es zeigt sich somit, daß für die Bindung von OPT an Protein Thiolgruppen nur untergeordnete Bedeutung besitzen.

3.1.9. Spontanhydrolyse von Bromobimanen

In TBS oder anderen wäßrigen Medien gelöst, entwickeln die Bromobimane eine Spontanhydrolyse, die das Vorhandensein von Thiolgruppen vortäuscht. Dieser Effekt ist zeitabhängig und beim Bromobimane MQ am stärksten ausgeprägt **(Abb.3.1.9.)**.

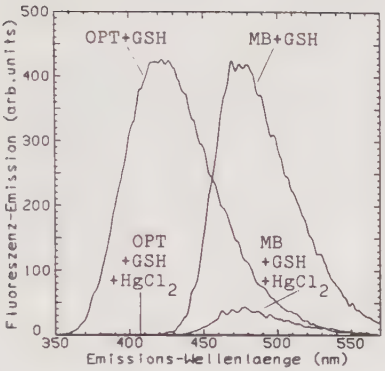


Abb.3.1.4. Emissionsspektren von 1:1 Komplexen aus GSH (5 µM) und OPT/MB. $HgCl_2$ (10 µM) reduziert OPT-Fluoreszenz vollständig, nicht bei MB. Ansatz 100 mM NaPP pH 7.4, 2 mM EDTA, Excitation 338 nm.

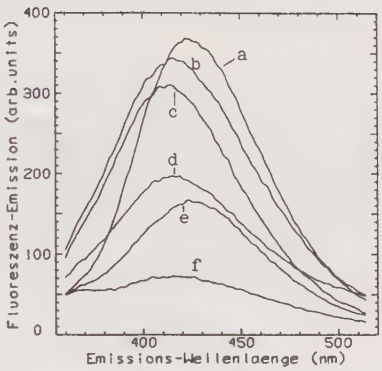


Abb.3.1.8.A. OPT (2 µM) bindet an äquimolar eingesetzte Proteine unter Fluoreszenzentwicklung, jedoch mit kürzerwelligen Maxima im Emissionsspektrum. Bedingungen wie 3.1.4. (a=GSH, b=Dispase, c=BSA, d=GOD, e=MPX, f=Glyoxalase).

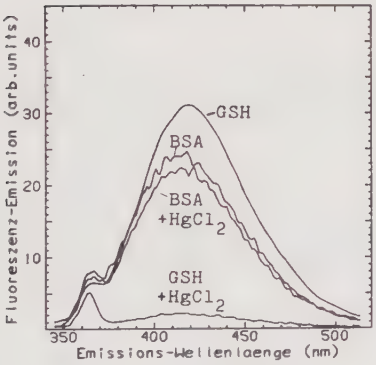


Abb.3.1.8.B. Emissionsspektren von 1:1 Komplexen (2 µM) aus GSH:OPT und BSA:OPT. $HgCl_2$ (4 µM) blockiert GSH-, aber nicht BSA-Bindung. Ansatz 100 mM NaPP pH 7.4, 2 mM EDTA, Excitation 338 nM.

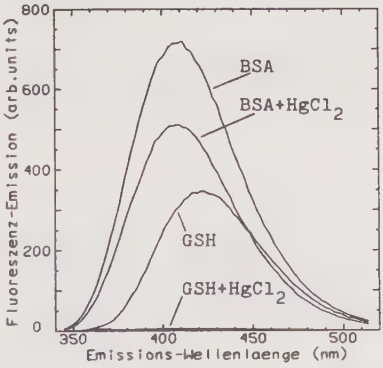


Abb.3.1.8.C. Ansatz wie in Abb.3.1.8.B, jedoch mit 100-fachem OPT-Überschuß (200 µM). Die Intensität des BSA:OPT-Komplexes liegt über der von GSH:OPT.

3.1.10. Nicht-enzymatische Oxidation von GSH durch Oxidantien

Die unterschiedlich schnell verlaufende, nicht-enzymatische Oxidation des GSH durch verschiedene Oxidantien läßt sich durch Reaktion des verbleibenden GSH mit OPT verfolgen **(Abb.3.1.10.)**. Im Gegensatz zum wenig reaktiven t-butyl-Hydroperoxid bewirkt das Diazene-Derivat Diamide eine rasche, vollständige Oxidation des GSH.

3.1.11. pH-Abhängigkeit der Reakion von OPT mit GSH

Wird die Umsetzung von GSH mit OPT bei verschiedenen pH-Werten untersucht, so findet man eine beschleunigte Reaktion im alkalischen Milieu **(Abb.3.1.11.,a)**.
Daß aber die Fluoreszenzintensität des OPT-GSH-Komplexes selber nicht pH-abhängig ist, geht aus der Inkubation eines zuvor hergestellten äquimolaren OPT-GSH-Addukts bei verschiedenen pH-Werten hervor **(Abb.3.1.11.,b)**.

Zusammenfassung

OPT besitzt gegenüber MB mehrere Vorteile: keine Eigenfluoreszenz, keine Spontanhydrolyse, höhere Fluoreszenzausbeute, Amino- und Thiolfunktion des GSH werden beide zur Ausbildung eines fluoreszenten Ringsystems benötigt. OPT bindet auch an Proteine, mit kürzerwelligem Emissionsmaximum und verringerter Sensibilität gegenüber Inhibierung durch Thiolblocker.

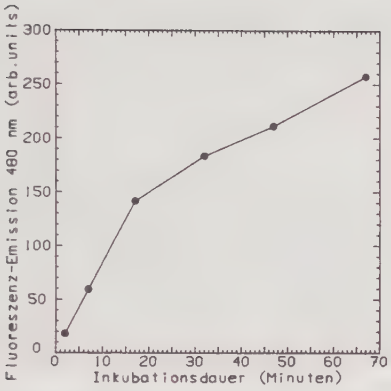


Abb.3.1.9. Hydrolyse von Bromobimanen. Diese werden in wäßrigen Medien rasch zum fluoreszenten Bimane hydrolysiert. Bei längeren Inkubationszeiten schränkt dies die Eignung zur Thioldetektion ein. Meßbedingungen: Lösung von Bromobimane MQ (10 µM) in TBS pH 7.4. Excitation 388 nm, Emission 480 nm.

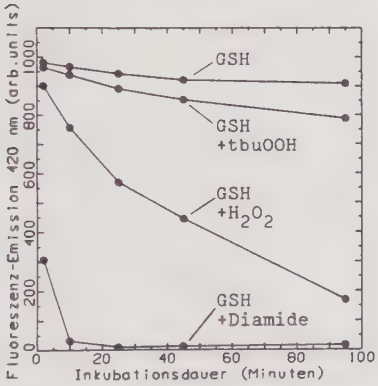


Abb.3.1.10. Nichtenzymatische Oxidation von GSH geschieht zeitabhängig und abhängig von der Reaktivität des Oxidationsmittels. Geringste Spontanreaktion zeigt t-buOOH. Ansatz: Tris (100 mM) pH 7.4 + EDTA (2 mM), GSH (10 µM) mit Oxidationsmittel (13 µM) inkubieren, färben mit OPT (50 µM, 5 min.). Excitation 338 nm, Emission 424 nm.

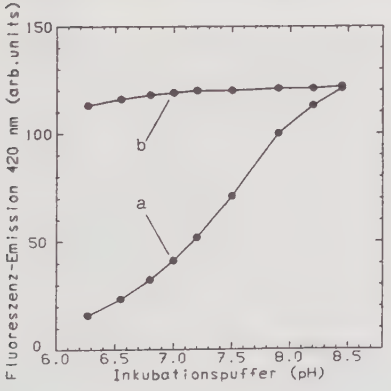


Abb.3.1.11. Abhängigkeit vom pH-Wert. OPT und GSH, bei verschiedenen pH-Werten zur Reaktion gebracht, setzen sich im basischen verstärkt zum fluoreszenten Addukt um (a). Wird dagegen ein Aliquot einer OPT-GSH-Stammlösung in Puffer verschiedener pH-Werte überführt, ergeben sich nur geringe Änderungen der Fluoreszenzintensität (b). Ansatz: OPT (0.5 mM), GSH (50 µM), NaPP-Puffer (100 mM). Excitation 338 nm, Emission 424 nm.

3.2. Fluoreszenzmikroskopie

3.2.1. Färbung mit OPT / PI

Werden ganze, intakte Zellen in HBS mit 0.1 mM OPT/ 60 µM PI inkubiert, so erscheinen die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop intensiv blau fluoreszent, wobei innere Strukturen (Kern o.ä.) nicht erkennbar sind **(Abb.3.2.1.A)**. Tote Zellen werden an einer Rotfluoreszenz erkannt, die aus Anlagerung von PI an die DNA resultiert. Infolge seiner Ladung kann PI nicht durch die intakten Membranen lebender Zellen permeieren, sie bleiben somit ungefärbt.
Bei manchen Zellproben (Beispiel: Ehrlich Ascites Zellen) wird bei höheren OPT-Konzentrationen (ab 1mM aufwärts) eine schnell ausbleichende Gelbfluoreszenz einiger Zellen beobachtet **(Abb.3.2.1.B)**, deren Bedeutung bisher unklar ist. Werden aber Zellen vor der OPT-Färbung mit 2 mM $HgCl_2$ inkubiert, so setzt dies die Blaufluoreszenz stark herab; die erwähnte Gelbfluoreszenz wird ebenso abgesenkt, was eine Beteiligung von Thiolgruppen an diesem Effekt nahelegt.
Wird als Farbstoff 0.1 mM MB in HBS verwendet, so zeigen die Zellen eine stabile, türkisfarbene Fluoreszenz **(Abb.3.2.1.-C)**. Diese Färbung reagiert äußerst empfindlich auf vorherige Inkubation mit Quecksilberchlorid, wobei die Ausbildung fluoreszenter Addukte nahezu vollständig inhibiert wird.

3.2.2. Effekt von PZ51 (Ebselen)

EA2P8 Zellen, die in einer 30 µM PZ51 Lösung inkubiert werden, zeigen eine deutliche Volumenzunahme, die unabhängig von dem verwendeten Farbstoff ist (OPT oder ADB).
Inkubation von Zellen in 1 mM H_2O_2 führt zur Ausbildung von Protrusionen an der Oberfläche; dieser Effekt unterbleibt in Anwesenheit von 30 µM PZ51.

Abb.3.2.1.A. Fluoreszenzmikrophotografie. Ehrlich Ascites Zellen, in OPT (0.1 mM) + PI (60 µM) gefärbt. Vergrößerung 100x. Excitation 300-400 nm, Emission 400-650 nm.

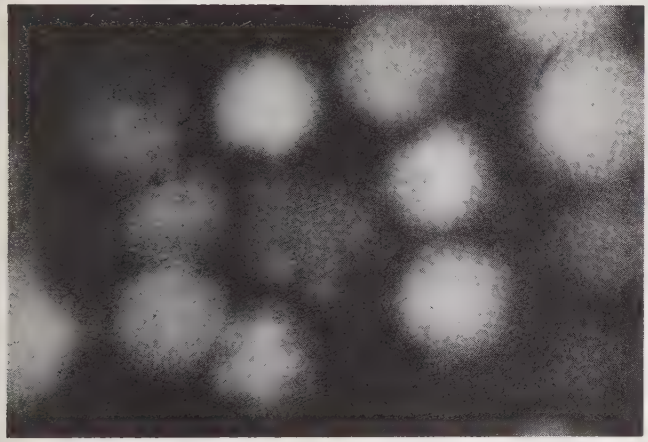


Abb.3.2.1.B. Fluoreszenzmikrophotografie. Wie in Abb.3.2.1.A., jedoch mit höherer Konzentration an OPT (10 mM). Vergrößerung 40x.

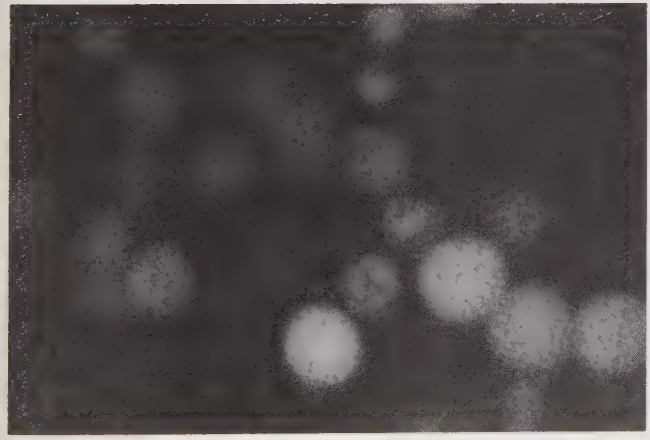


Abb.3.2.1.C. Fluoreszenzmikrophotografie. Wie in Abb.3.2.1.A., jedoch Färbung mit Bromobimane MB (0.4 mM) + PI (60 µM). Vergrößerung 40x.

3.3. HPLC

Mit Hilfe der Gelsieb-HPLC werden Lysate von gefärbten Zellen nach Molekulargewicht aufgetrennt, wobei eine hochmolekulare (proteinhaltige) und eine niedermolekulare (GSH-haltige) Fraktion erhalten wird. Um Messungen untereinander vergleichen zu können, wird auf den höchsten Proteinpeak standardisiert und die Fluoreszenz mit dem entsprechenden Faktor korrigiert.

3.3.1. Auftrennung von Lysaten OPT-gefärbter Zellen nach Molekulargewicht

Abb.3.3.1. zeigt ein Trennprofil mit der simultanen Darstellung von Protein (a) und Fluoreszenz (b). Die gleichzeitige Messung der Proteinkonzentration als Maß der aufgetragenen Zellmenge ermöglicht die Standardisierung auf den höchsten Proteinpeak und damit den direkten Vergleich der Fluoreszenzen aus unterschiedlichen HPLC-Trennungen. Es ist offensichtlich, daß OPT-fluoreszente Addukte nicht nur in den niedermolekularen Fraktionen (in denen GSH auftritt) lokalisiert sind, sondern auch in hochmolekularen, proteinhaltigen Fraktionen.
Ein entsprechender Versuch ohne vorherige Färbung zeigt, daß die Autofluoreszenz des Zellmaterials vernachlässigbar gering ist **(Abb.3.3.1.,c)**.

3.3.2. Einfluß von SDS auf die Fluoreszenzverteilung

Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von hoch-/niedermolekularen Fraktionen hängt stark ab von der zur Lysatgewinnung verwendeten Aufschlußmethode: **Abb.3.3.2.** zeigt in Analogie zu Abb.3.3.1. das Elutionsdiagramm für ein Lysat, dem zusätzlich zur Ultraschall-Homogenisierung noch 0.5% SDS in Lyse- und Laufpuffer beigefügt sind. Aus dieser Maßnahme resultiert eine wesentlich höhere Solubilisierung

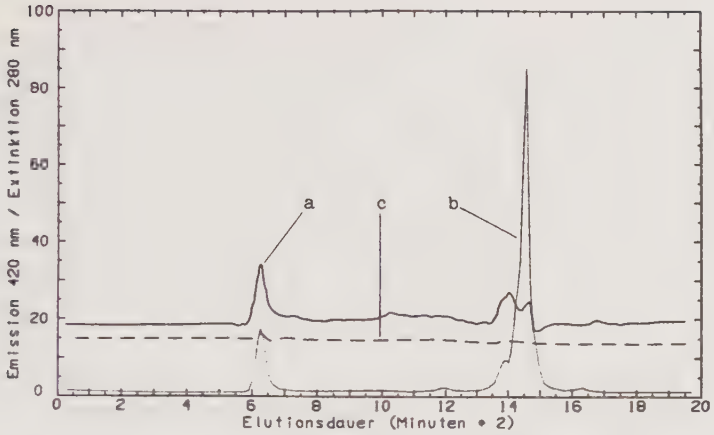


Abb.3.3.1. HPLC-Analyse OPT-gefärbter Zell-Lysate. Zellmaterial (EA2P8) wird in HBS mit OPT gefärbt (1 mM, 5 min.), gewaschen, per Ultraschall lysiert. Filtriertes Lysat wird auf Gelsieb TSK-3000 aufgetragen. Laufpuffer Hepes (50 mM) pH 7.3 + EDTA (2 mM). Flußrate 0.8 ml/min. Simultane Messung von Extinktion (**a**) und Fluoreszenzemission (**b**) mittels Durchflußküvetten. Extinktion 280 nm, Emission 424 nm, Excitation 338 nm. - Der Hauptteil der Fluoreszenz ist in der niedermolekularen, GSH-haltigen Fraktion lokalisiert (Retentionszeit 29 min.). Autofluoreszenz des ungefärbten Zellmaterials ist vernachlässigbar gering (**c**).

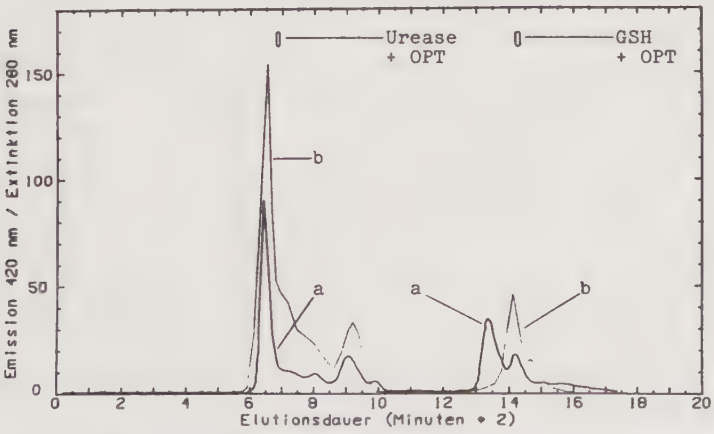


Abb.3.3.2. HPLC-Trennprofil OPT-gefärbter Zell-Lysate: Einfluß von Detergenz. Bedingungen wie in Abb.3.3.1., aber unter Zusatz von SDS (0.5%) zu Lyse- und Laufpuffer. - Maximum der Fluoreszenzemission ist jetzt mit der hochmolekularen Fraktion (Retentionszeit 12-19 min.) assoziiert. (**a** Extinktionsmessung, **b** Emissionsmessung). - Calibration der HPLC durch OPT-Komplexe mit Urease bzw. GSH, die in einem separaten Lauf aufgetrennt wurden.

der Proteinbestandteile, damit aber auch eine Verschiebung des Fluoreszenzverhältnisses zuungunsten der OPT-GSH-Fluoreszenz. Da aber bei dieser Methode die Zellen durch den Lysepuffer regelrecht 'aufgelöst' werden, und bei der nachfolgenden Zentrifugation kaum Rückstand verbleibt, wird hiermit eher das tatsächliche Verteilungsmuster der Fluoreszenz in ganzen, intakten Zellen erfaßt; deshalb werden die folgenden Trennungen alle in Anwesenheit von SDS durchgeführt.
Die Stellen (O) markieren das Erscheinen von GSH-OPT (niedermolekular) und Urease-OPT (hochmolekular) im Eluat, die zwecks Eichung in einem separaten Lauf unter denselben Bedingungen aufgetrennt wurden.

3.3.3. Einfluß der OPT-Konzentration auf die Färbung

Einfluß auf das Verhältnis der Fluoreszenzpeaks hat auch die zur Färbung verwendete Farbstoff-Konzentration: da OPT über zwei reaktive Aldehydgruppen verfügt, kann es bei höherer OPT-Konzentration (5-10 mM) zu einer Vernetzung der Proteinbestandteile kommen, wodurch sich das Fluoreszenzverhältnis scheinbar zugunsten des OPT-GSH bessert **(Abb.3.3.3.A)**; tatsächlich jedoch verringert sich die relative Konzentration des im Auftrag enthaltenen Proteins, was als vernetztes, jedoch fluoreszentes Pellet nicht auf die Säule aufgetragen wird. Dies führt zu einer fehlerhaften Überbewertung der relativen GSH-OPT-Fluoreszenz. Wird jedoch die OPT-Konzentration auf 0.05-0.5 mM reduziert, so unterbleibt die Vernetzung, und das Protein erscheint sowohl in der Extinktions- als auch in der Fluoreszenzmessung **(Abb.3.3.3.B)**.

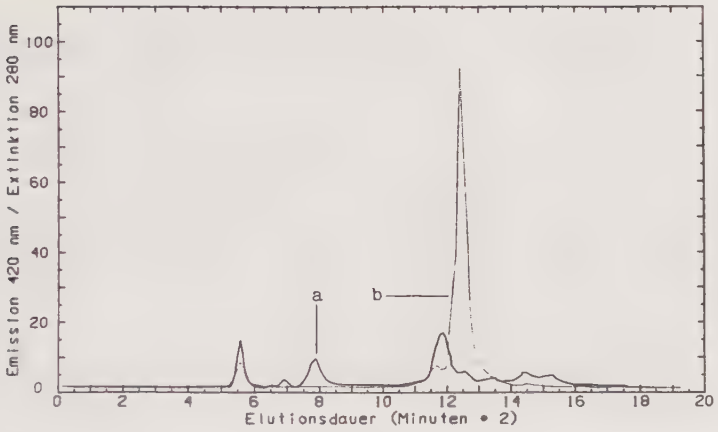


Abb.3.3.3.A. HPLC-Trennprofil in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration. Bedingungen wie in Abb.3.3.2., jedoch höhere OPT-Konzentration (15 mM), Flußrate 0.9 ml/min. - Offensichtlich beträgt die Fluoreszenzintensität der niedermolekularen, GSH-haltigen Fraktion ein Vielfaches der hochmolekularen Fraktion. Ersichtlich aus der Extinktionsmessung, gelangt jedoch nur ein Bruchteil des fluoreszenten Proteins überhaupt zur Auftrennung, da OPT höher Konzentriert vernetzend wirkt. (a=Extinktion, b=Fluoreszenzemission).

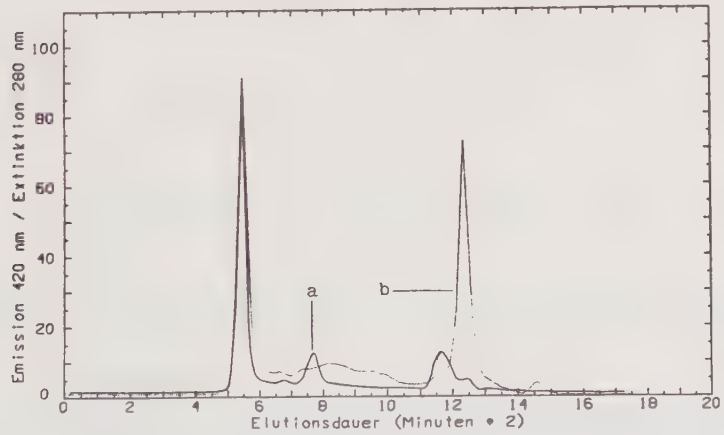


Abb.3.3.3.B. HPLC-Trennprofil in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration. Gleicher Ansatz wie in Abb.3.3.3.A, aber geringere Konzentration an OPT (0.15 mM). - Fluoreszentes Protein wird vollständig erfaßt, erkennbar am Extinktionsmaximum hochmolekularer Fraktionen mit kurzen Retentionszeiten. Die niedermolekulare, GSH-haltige Fraktion repräsentiert jetzt einen geringeren Anteil der gesamten Fluoreszenzemission.

3.3.4. Spektrale Charakterisierung der OPT-gefärbten Zellbestandteile

Die Emissionsspektren der hochmolekularen (proteinhaltigen) Fraktionen der HPLC-Trennung weisen ein kürzerwelliges Maximum (408 nm) auf **(Abb.3.3.4.)** und unterscheiden sich so vom Maximum der niedermolekularen, GSH-haltigen Fraktion (424 nm).
Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten variiert stark in Abhängigkeit vom verwendeten Zellmaterial und den Inkubationsbedingungen; übliche Meßwerte sind 3:1 bis 8:1 (hochmolekular:niedermolekular).

3.3.5. Einfluß von Thiolblockern auf die Reaktion mit OPT

Bei EA2P8 Zellen inhibiert eine Inkubation mit Quecksilberchlorid vollständig die Reaktion von OPT mit niedermolekularen Zellbestandteilen, während die proteinhaltigen Fraktionen nur mäßig gehemmt werden **(Abb.3.3.5.A,B)**. Der Grad dieser Hemmung hängt ab vom verwendeten Zellmaterial bzw. den Inkubationsbedingungen der Zellkultur: werden die Zellen 1-6 h vor der Färbung einem Mediumwechsel unterzogen, so erhöht sich die Sensibilität der Proteinfluoreszenz gegenüber einer Inhibierung durch Quecksilbersalze.
Die nach einer Quecksilberbehandlung erhaltene Restfluoreszenz repräsentiert die Bindung von OPT an Protein ohne Beteiligung von Thiolgruppen und kann rechnerisch als Differenz der Messungen mit/ohne Thiolblocker eliminiert werden.
Ersatz des Quecksilbers durch den membranimpermeablen Thiolblocker PCMS bringt kaum Reduktion der niedermolekularen Fluoreszenz, was OPT als membranpermeable Substanz ausweist.

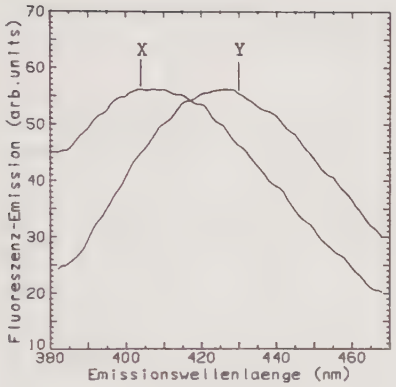


Abb.3.3.4. Emissionsspektren der hoch-/niedermolekularen Fraktionen aus Abb.3.3.3.B. Die proteinhaltige Fraktion (X, Retentionszeit 11 min.) besitzt mit 408 nm ein kürzerwelliges Emissionsmaximum als die GSH-haltige Fraktion (Y, Retentionszeit 24 min.) mit 424 nm. Excitation 338 nm.

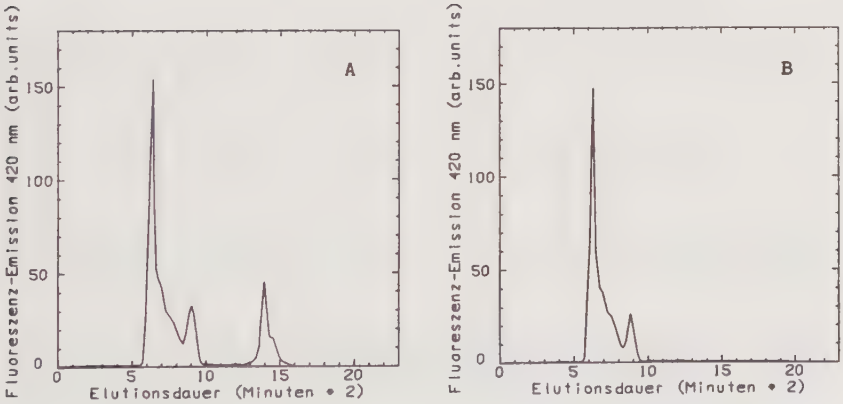


Abb.3.3.5.A./B. Fluoreszenzprofil der HPLC-Trennung von Zell-Lysaten. Das Zellmaterial (EA2P8) wird vor (A) bzw. nach (B) Inkubation in $HgCl_2$ (2 mM, 10 min) mit OPT gefärbt (1 mM, 5 min.), lysiert und nach Molekulargewicht aufgetrennt. Detektion der fluoreszenten Fraktionen geschieht über eine Durchflußküvette. Excitation 338 nm, Emission 420 nm. - Die OPT-Bindung an hochmolekulare Zellbestandteile wird durch $HgCl_2$ nur moderat beeinflußt, vollständig jedoch die Reaktion mit GSH.

3.3.6. Einfluß von Oxidantien auf die intracelluläre Reaktion von GSH mit OPT

Inkubation von EA2P8 Zellen mit H_2O_2 vor der OPT-Färbung reduziert die niedermolekulare Fluoreszenz schon in Konzentrationen ab 0.05 mM H_2O_2, ohne die Reaktion von OPT mit Protein wesentlich zu beeinflussen **(Abb.3.3.6.A/B)**. Mit steigenden Konzentrationen des Oxidationsmittels läßt sich die niedermolekulare Fluoreszenz regelrecht titrieren bis auf ein Minimum **(Abb.3.3.6.C/D)**; gleiche Messungen werden auch unter Verwendung von Cumolhydroperoxid oder tbuOOH als Oxidantien erhalten, wobei jedoch H_2O_2 effektiver ist. Mit Diamid als Oxidanz wird neben der Reduktion der niedermolekularen Fluoreszenz auch eine Abnahme der hochmolekularen Fluoreszenz gemessen.

3.3.7. Präparatives Gelsieb mit DC

Zellen werden mit 1 mM OPT angefärbt und das Lysat im präparativen Maßstab mittels HPLC-Gelsieb getrennt. Laut **Abb.3.3.7.A.** werden 7 Fraktionen gepoolt und mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatografie weiter charakterisiert. Als Referenz dient ein äquimolarer GHS-OPT-Komplex ('G'). Das DC zeigt unter Belichtung mit UV-Licht fluoreszente Flecken **(Abb.3.3.7.B.)**, die bei den hochmolekularen Fraktionen am Auftragsort zurückbleiben, bei der niedermolekularen Fraktion jedoch rasch wandern (Rf-Wert 0.91). Die Fluoreszenz verschwindet schnell mit dem Trocknen der DC-Platte, läßt sich jedoch durch Befeuchten wieder regenerieren. Die Ninhydrinprobe reagiert im Fall der proteinhaltigen Fraktionen positiv, jedoch kaum mit der GSH-haltigen Fraktion.

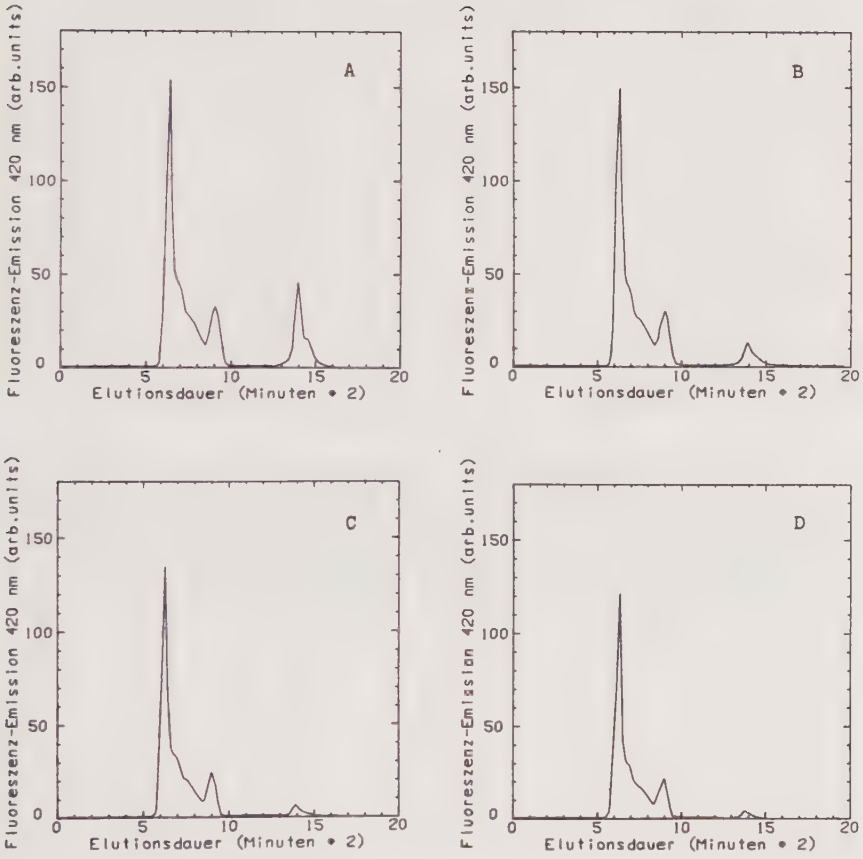


Abb.3.3.6.A/B/C/D. HPLC-Fluoreszenzprofil: Oxidation von intracellulärem GSH durch H_2O_2. Zellen (EA2P8) werden in HBS 10 Minuten mit H_2O_2 inkubiert (A 0 mM, B 50 µM, C 0.25 mM, D 1 mM), in HBS gewaschen und OPT-gefärbt (1 mM, 5 min.), lysiert und nach Molekulargewicht aufgetrennt. Fluoreszenzintensitäten werden rechnerisch über simultane Extinktionsmessung auf einheitliche Proteinkonzentration standardisiert. Excitation 338 nm, Emission 420 nm, Extinktion 280 nm. Trennbedingungen: Laufpuffer A + 0.5 % SDS (s.2.7.2.), Flußrate 0.8 ml/min. - Bereits geringe Mengen H_2O_2 (B) bewirken starke Fluoreszenzabnahme der GSH-haltigen Fraktion (Retentionszeit 28 min.) im Vergleich zur Kontrolle (A). Mit höheren Dosen läßt sich die Fluoreszenz weiter absenken (C), ein Minimum wird aber auch bei Dosen >1 mM nicht unterschritten (D).

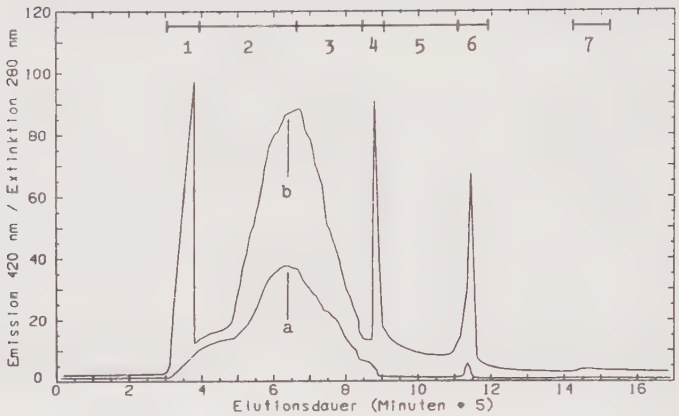


Abb.3.3.7.A. HPLC-Trennprofil (präparativ) von Lysaten OPT-gefärbter Zellen. 1 ml Zellsuspension (EA2P8) wird in HBS mit OPT behandelt (1 mM, 5 min.), in Laufpuffer C (s.2.7.2.) mit Ultraschall lysiert und per Gelsieb (TSK-G 3000SWG) aufgetrennt. Trennbedingungen: Laufpuffer C, 2.4 ml/min. Die eluierten fluoreszenten Fraktionen (1-7) werden lyophilisiert und per Dünnschichtchromatografie analysiert. (a Extinktionsmessung 280 nm, b Fluoreszenzemission 420 nm, Excitation 338 nm).

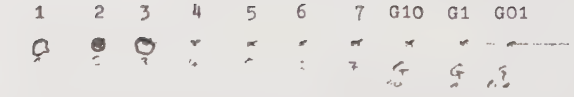


Abb.3.3.7.B. Dünnschichtchromatografische Analyse. Die Lyophilisate aus Abb.3.3.7.A. werden in etwas H_2O gelöst auf Kieselgel DC-Platten aufgetragen (1-7). Als Referenz dient ein äquimolarer GSH-OPT-Komplex in drei Konzentrationen (G). Laufbedingungen siehe 2.7.5. - UV-Auflicht (366 nm) läßt auf der fertigen Platte bei 6 eine fluoreszente Bande sichtbar werden, mit gleicher Laufcharakteristik wie die Referenz. Am Auftragsort der hochmolekularen Fraktionen (1,2,3) bleibt ein fluoreszenter 'spot' zurück, der sich mit Ninhydrin intensiv anfärbt.

3.3.8. Auftrennung von Lysaten MB-gefärbter Zellen nach Molekulargewicht

Ähnlich wie OPT bindet auch Bromobimane MB an nieder- und hochmolekulare Zellbestandteile **(Abb.3.3.8.A.)**, wobei ein breites Spektrum hochmolekularer Komponenten fluoreszent markiert wird.
Im Gegensatz zu OPT inhibiert die Anwesenheit von Quecksilberchlorid vollständig die Bindung von MB an zelluläre Bestandteile **(Abb.3.3.8.B.)**; ein gelegentlich zu beobachtender kleiner, niedermolekularer peak resultiert aus der im wäßrigen Medium spontan ablaufenden Hydrolyse der Substanz.

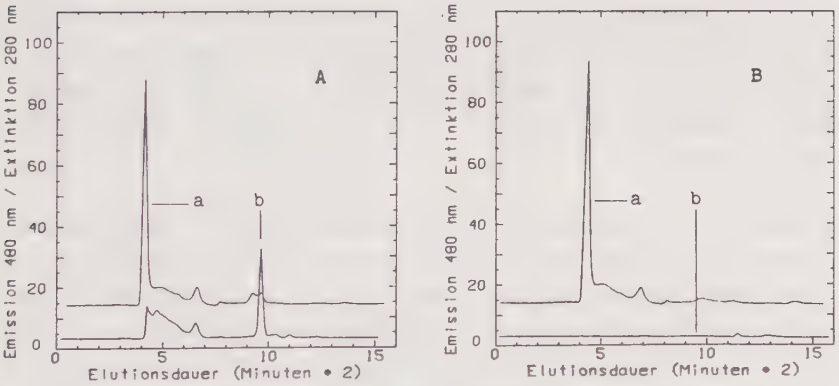


Abb.3.3.8.A./B. HPLC-Trennprofile von Lysaten MB-gefärbter Zellen: Wirkung von Thiolblockern. Zellmaterial (P3b6) wird vor (A) bzw. nach (B) Inkubation in $HgCl_2$ (3 mM, 10 min.) mit Monobromobimane MB gefärbt (0.2 mM, 5 min.), lysiert und nach Molekulargewicht aufgetrennt. Laufpuffer TBS pH 7.4 (0.1% SDS), Flußrate 1 ml/min. Simultane Bestimmung von Extinktion und Fluoreszenz im Eluat mittels Durchflußküvetten (a=Extinktion 280 nm, b=Emission 480 nm, Excitation 388 nm). - MB bindet fluoreszent an diverse hoch- und niedermolekulare Zellbestandteile (A), wird jedoch durch $HgCl_2$ vollständig inhibiert (B).

3.4. Untersuchungen mit dem Durchflußcytometer

3.4.1. Färbungen

3.4.1.1. Färbung mit OPT / PI

Abb.3.4.1.1.A/B/C repräsentieren die Ergebnisse einer durchflußcytometrischen Messung, wobei die Zellen zuvor mit 60 uM PI (**A**), 1 mM OPT (**B**) und einer Kombination von beiden (**C**) angefärbt wurden. Die Filterkombination ist so gewählt, daß das von den Zellen emittierte Licht in blaue Anteile (Fluoreszenz 1, F1) und blaugrüne + rote Anteile (Fluoreszenz 2, F2) gesplittet wird. Somit erscheinen nach alleiniger PI-Färbung (**A**) nur die toten Zellen, und zwar nach Volumen und F2-Fluoreszenz. Im Fall einer alleinigen OPT Färbung (**B**) wird durch die Aufteilung des emittierten Lichts auf beide Fluoreszenzkanäle eine räumlich andersartige Verteilung der Zellen erhalten. Die Kombination beider Färbungen (**C**) zeigt, daß nur lebende (PI-negative) Zellen von der OPT-Färbung erfaßt werden.

Die hier gezeigte 'dreidimensionale' Darstellung ('Würfel') berücksichtigt zwar alle drei gemessenen Größen einer jeden Zelle, hat aber den Nachteil, daß die Anzahl der Zellen nicht unmittelbar mit eingeht; durch Projektion auf je eine der drei Ebenen wird eine Reduktion auf Zweiparameter- bzw. Einparameter-Darstellung vorgenommen (**Abb.3.4.1.-1.D**). Weiterhin besteht rechnerisch die Möglichkeit, einzelne Zellen oder Zellpopulationen nach einer ihrer Eigenschaften abzutrennen (Beispiel Fluoreszenz: tote Zellen sind nach PI-Färbung rote Zellen) und diese hinsichtlich anderer Eigenschaften (z.B. Volumen) zu untersuchen.

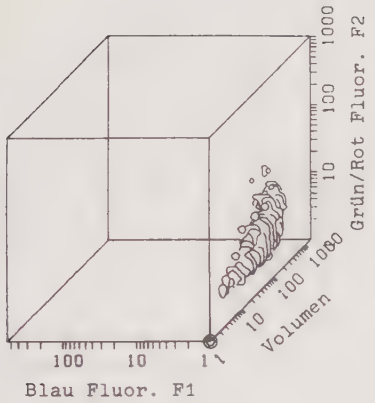


Abb.3.4.1.1.A. Dreiparameter Histogramm einer durchflußcytometrischen Analyse von Zellen (P3b6), gefärbt mit PI (60 µM,5min.). Logarithmische Fluoreszenzskalen sind dimensionslos. Eine logarithmische Einheit der Zellvolumen-Skala entspricht 13 μm^3. Nur tote Zellen werden erfaßt, deren DNA durch PI rotfluoreszent angefärbt ist (gemessen: 2155 Zellen). Filtersatz: OPT/PI, siehe 2.10.2.

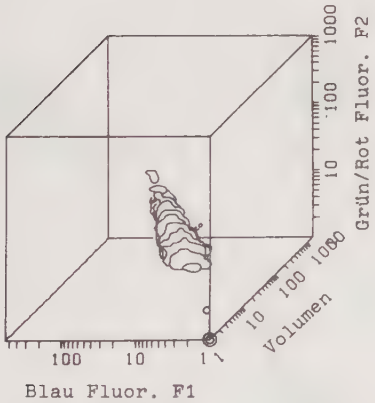


Abb.3.4.1.1.B. Wie Abb.3.4.1.1.A, jedoch Färbung mit OPT (1 mM, 5 min.). Die Zellen weisen jetzt blaue und blaugrüne Anteile in der Fluoreszenzemission auf und erscheinen dadurch in beiden Fluoreszenzlicht-Kanälen (F1,F2).

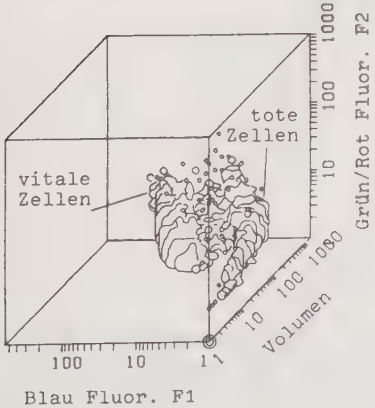


Abb.3.4.1.1.C. Wie zuvor, jedoch Kombinationsfärbung mit OPT (1 mM) + PI (60 µM). Vitale und tote Zellen sind in einer einzigen Messung voneinander unterscheidbar.

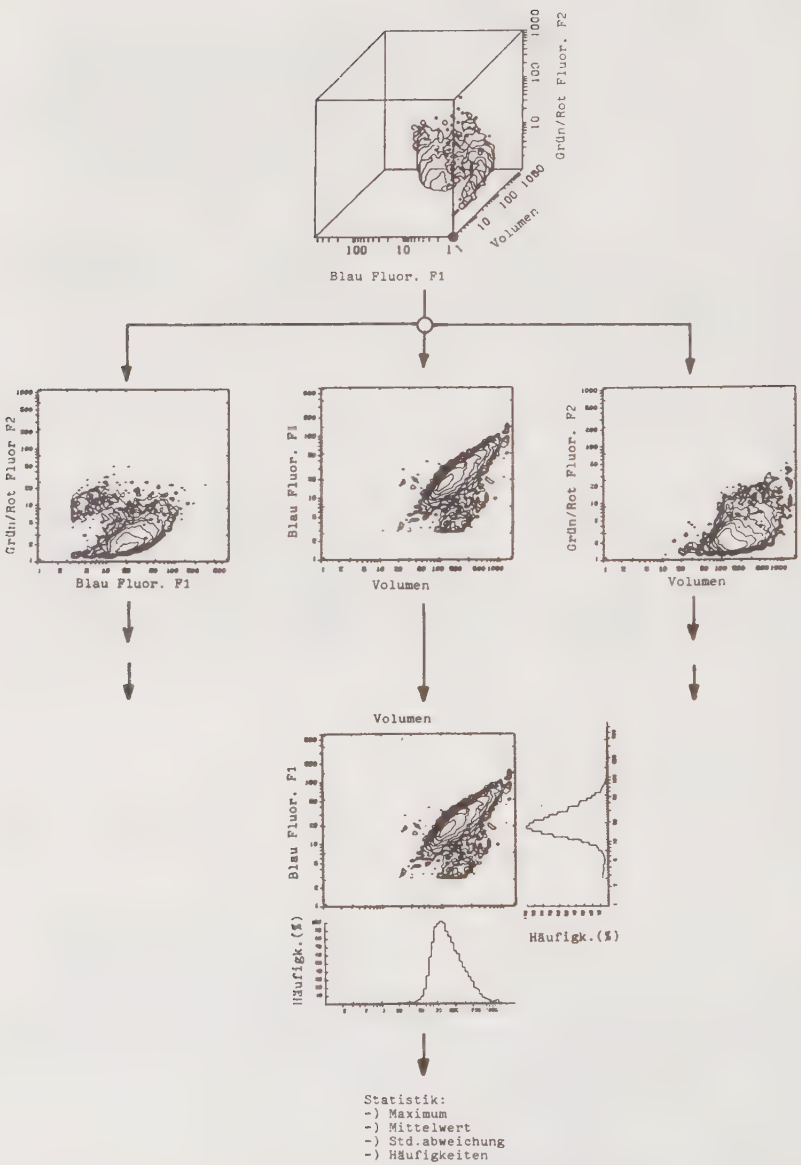


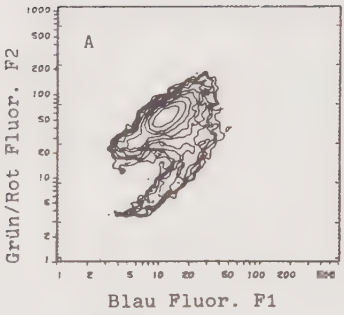
Abb.3.4.1.1.D. Prinzipielle Darstellungsmöglichkeiten durchflußcytometrischer Meßdaten. Aus dem Dreiparameter-Histogramm (ganz oben) werden durch Projektion entlang der Achsen drei Zweiparameter-Histogramme (mitte) erzeugt, die sich ihrerseits zu Einparameter-Histogrammen (Häufigkeitsverteilungen) reduzieren lassen.

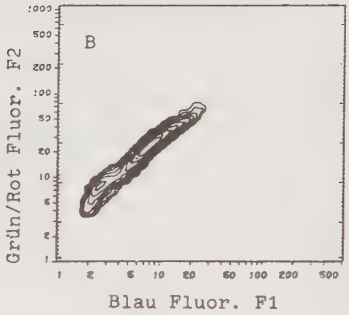
3.4.1.2. Färbung mit thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen

Inkubation in thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen färbt die Zellen an und läßt sie dadurch im Durchflußcytometer sichtbar werden. Sind die Filter für die Fluoreszenzkanäle so gewählt, daß im Emissionsmaximum des Farbstoffs das Licht auf beide Photomultiplier trifft, so ermöglicht eine Darstellung der Meßergebnisse im F2/F1-Diagramm die Aussage über eventuell auftretende Wellenlängen-Shifts; diese treten auf, wenn der Farbstoff in seinen Fluoreszenzeigenschaften vom Bindungspartner beeinflußt wird. **Abb.3.4.1.2.A/B/C** zeigt einen Vergleich von OPT-behandelten EA2P8-Zellen mit solchen, die in Bromobimane MB (s.3.1.2.) oder Fluoranthylmaleimid inkubiert wurden. Gut erkennbar zeigen OPT-gefärbte Zellen unterschiedliches Verhalten: sie emittieren Licht verschiedener Wellenlängen, dadurch gibt es eine Aufspaltung je nach Farbe der Emission. Bereits bei HPLC-Experimenten wurde beobachtet, daß OPT je nach Bindungspartner (Protein, GSH) unterschiedliche Emissionsmaxima aufweist, was sich in der Durchflußcytometrie an Einzelzellen bestätigt. Im Fall vom Bromobimane MB tritt dieser Effekt kaum, bei Fluoranthylmaleimid überhaupt nicht auf.

3.4.1.3. ADB / PI Färbung

ADB ist ein zellpermeierendes Esterasesubstrat, was nach Spaltung ein fluoreszentes Dicyanohydrochinon liefert, dessen Emissionsspektrum pH-abhängig ist. In Kombination mit PI dient ADB als Vitalfärbung, die zugleich mehrere Informationen liefert: tot/lebend, Esteraseaktivität, intracellulärer pH. **Abb.3.4.1.3.** zeigt das Ergebnis einer solchen Färbung; tote Zellen können aufgrund ihrer PI-Fluoreszenz im F2/F1-Diagramm leicht detektiert, abgetrennt und berechnet werden. In diesem Diagramm ist die Lage jeder einzelnen Zelle eine Funktion ihrer Esteraseaktivität und ihres intracellulären pH-Wertes. Mit einer Eichung läßt sich der absolute, celluläre pH-Wert leicht bestimmen.





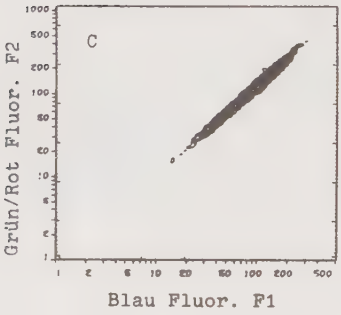


Abb.3.4.1.2.A/B/C. Durchflußcytometrie: Thiolreaktive Farbstoffe im Vergleich. Zellen (EA2P8) spalten im Fl/F2-Diagramm je nach Färbung (**A** 0.5 mM OPT, **B** 0.5 mM MB, **C** 0.1 mM Fluoranthylmaleimid) sehr unterschiedlich auf. Dieser Effekt tritt dann auf, wenn die spektrale Charakteristik der Fluoreszenzemission abhängig ist vom Ursprung der bindenden Thiolgruppe. Während Fluoranthylmaleimid (**C**) und Bromobimane MB (**B**) keine bzw. wenig Aufspaltung zeigen, ist der Effekt bei OPT (**A**) ausgeprägt.

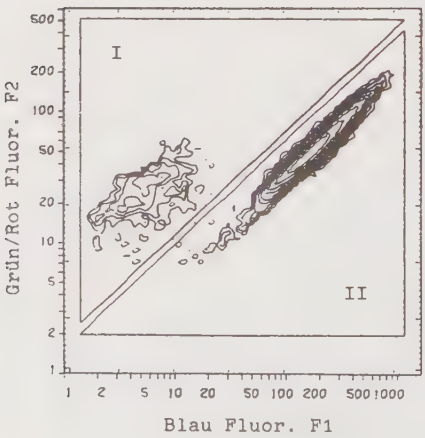


Abb.3.4.1.3. Durchflußcytometrie: ADB/PI-Färbung. Aus ADB setzen Zellen via Esterasen intracellulär fluoreszentes DCH frei, dessen Emissionscharakteristik abhängig vom pH-Wert ist. In Verbindung mit PI, was die DNA toter Zellen fluoreszent anfärbt, wird ADB zur Bestimmung von Vitalität (Emissionsintensität) und intracellulärem pH-Wert (Emissionsspektrum) verwendet. Ansatz: EA2P8 Zellen in HBS mit ADB (80 um) + PI (60 µM) 5 Minuten gefärbt.

I : tote Zellen (7.2%)
II : lebende Zellen (92.8%)

3.4.2. Unterschiedliche Zelltypen nach Färbung mit OPT

Abb.3.4.2.A-F zeigen OPT-gefärbte Zellen unterschiedlicher Herkunft als (Volumen/Fluor.2) Diagramme: hier werden von jeder Zelle der Volumenwert und der entsprechende Fluoreszenzwert aufgetragen und die Punkte gleicher Zellzahl per 'Höhenlinien' miteinander verbunden. Ehrlich Ascites und Zajdela Ascites sind Frischpunktate von Nagern und können ohne weitere Vorbehandlung gemessen werden. Yoshida Sarkom, Leber und Lunge sind mittels Gewebepresse oder Hackmesser zerkleinert und gesiebt. CHO-Zellen stammen aus einer Zellkultur.

Die einzelnen Zelltypen verursachen sehr unterschiedliche Muster und sind als 'Modell' zur weiteren Untersuchung der OPT-Färbung nur bedingt geeignet; es wird für weitere Experimente meist Ehrlich Ascites verwendet, da hier die Zellverteilung sehr einheitlich und damit gut auswertbar ist (s.Abb.3.4.2.F). Weitere Vorteile: die Zellen spalten in zwei Populationen auf (Tumorzellen bzw. Lymphocyten, erkennbar am Volumen) und liegen bereits als Suspension vor, so daß keine Gewebsaufarbeitung nötig wird; außerdem sind die Zellen nur wenig adhärent.

3.4.3. Einfluß des intracellulären Thiolgehaltes auf die OPT-Färbung

Der Gesamt-Thiolgehalt einer Zelle setzt sich zusammen aus Proteinthiolen und niedermolekularem Thiolpool, der in der Hauptsache aus GSH besteht. Möglichkeiten zur Beeinflussung gibt es mehrere mit unterschiedlich hoher Spezifität für GSH: 1) Blocken der Thiolgruppe 2) Oxidation der Thiolgruppe 3) Enzymatische Inhibierung des GSH-Zyklus.

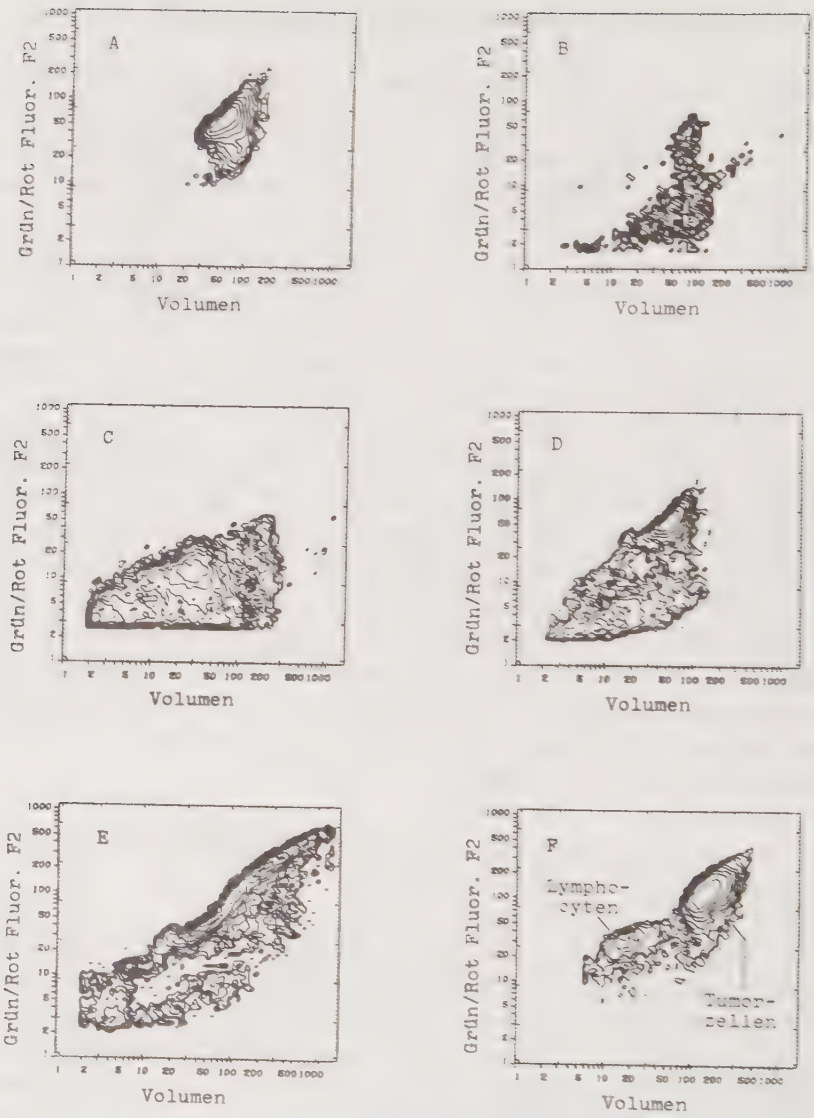


Abb.3.4.2.A-F. Zweiparameter-Histogramme unterschiedlicher Zelltypen nach OPT-Färbung (1 mM): **A** CHO-Zellkultur, **B** Lungengewebe (Maus), **C** Leber (Maus), **D** Yoshida Sarkom (Ratte), **E** Zajdela Ascites Hepatom (Ratte), **F** Ehrlich Ascites (Maus). Letztere setzen sich aus Lymphocyten und Tumorzellen zusammen, die aufgrund unterschiedlicher Zellvolumina gut unterscheidbar sind.

3.4.3.1. Einsatz von Thiolblockern

3.4.3.1.1. Wirkung auf OPT-Färbung

Abb.3.4.3.1.1.A/B zeigt die Wirkung von 4mM $HgCl_2$ nach 5 Minuten Inkubation und anschließender OPT-Färbung. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne $HgCl_2$. Es tritt eine starke Reduktion der F2-Fluoreszenz auf, während F1 nur moderat abnimmt. Keine Unterschiede dagegen werden erhalten, wenn die $HgCl_2$-Inkubation nach der OPT-Färbung erfolgt.

Die hier verwendete Filterkombination trennt das emittierte Licht in einen kürzerwelligen (F1) und einen längerwelligen Kanal (F2) auf. Da mittels HPLC-Trennung von Lysaten OPT-gefärbter Zellen für OPT-Protein-Addukte ein kürzerwelliges Emissionsmaximum ermittelt wurde als für die entsprechenden OPT-GSH-Addukte (s.3.3.4.), repräsentiert F1 in der Hauptsache an Protein gebundenes OPT, F2 jedoch die Summe aus proteingebundenem und GSH-gebundenem OPT. Die F1-Fluoreszenz wird durch $HgCl_2$ relativ wenig reduziert - ein Hinweis darauf, daß ein Teil des OPT ohne Beteiligung von Thiolgruppen an Protein gebunden wird. Sinngemäß entspricht die durch $HgCl_2$ erzielte Reduktion der Fluoreszenz zahlenmäßig der Summe aller derjenigen thiolhaltigen Moleküle, die tatsächlich OPT gebunden haben.

Auch andere Thiolblocker (4 mM DEM, 2 mM Ethacrynsäure) verursachen Fluoreszenzreduktion; **Abb.3.4.3.1.1.C.** zeigt vergleichend die Wirkung von $HgCl_2$, NEM und PCMS. Die letztgenannte Substanz kann intakte Zellmembranen nicht permeieren. Auch bei hohen PCMS-Konzentrationen reduziert sich die Fluoreszenz nur moderat und erreicht nie den durch $HgCl_2$ verursachten Wert, was die auch mikroskopisch sichtbare Lokalisation der Hauptfluoreszenz im Zellinnern unterstreicht.

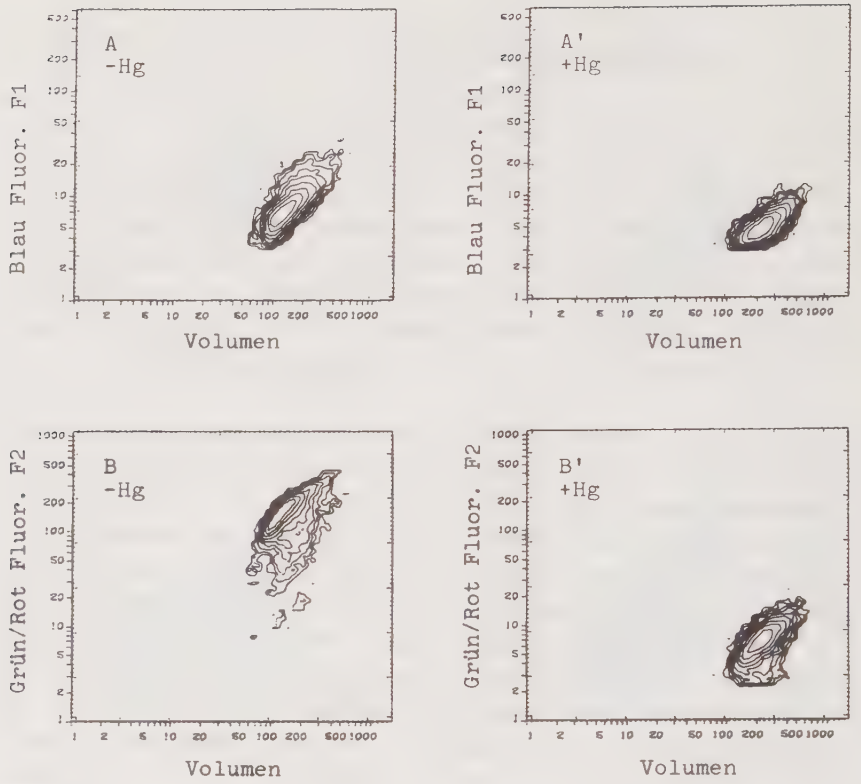


Abb.3.4.3.1.1.A/B Zweiparameter-Histogramme OPT-gefärbter Zellen: Wirkung des Thiolblockers $HgCl_2$. Ehrlich Ascites Tumorzellen werden vor (**A,B**) bzw. nach (**A',B'**) einer Inkubation in $HgCl_2$ (4 mM in HBS, 5min.) mit OPT gefärbt (0.5 mM, 5 min.) und ohne weitere Behandlung durchflußcytometrisch gemessen (Filtersatz OPT, siehe 2.10.2.). Die Histogramme zeigen die Volumen/Fluoreszenzverteilung für den kürzerwelligen Fluoreszenzlicht-Kanal **A/A'** (Fl 400-420 nm), sowie für den längerwelligen Kanal **B/B'** (F2 450-600 nm). - Anwesenheit von $HgCl_2$ verursacht in Fl einen nur geringen Rückgang im Vergleich zur Kontrolle. Dagegen verringert sich die Intensität der längerwelligen Fluoreszenzemission F2 deutlich.

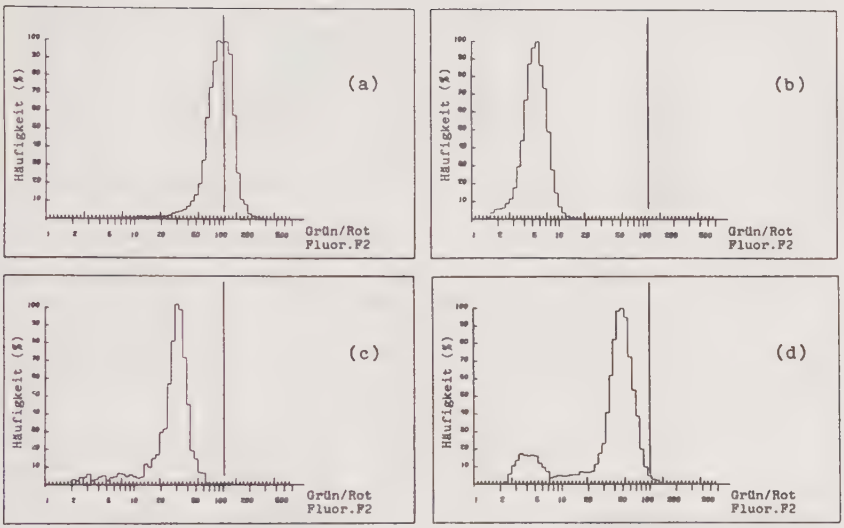


Abb.3.4.3.1.1.C. Einparameter-Histogramme (Fluoreszenz F2): Vergleich verschiedener Thiolblocker. Ehrlich Ascites Tumorzellen werden nach Einwirkung einer thiolreaktiven Substanz (4 mM in HBS, 5 min.) mit OPT gefärbt (0.5 mM, 5 min.) und durchflußcytometrisch untersucht. **a** Kontrolle, **b** $HgCl_2$, **c** NEM, **d** PCMS. Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der Intensität im längerwelligen Fluoreszenzlicht-Kanal F2. Die eingezeichnete Linie dient zur besseren Vergleichbarkeit der Diagramme. - Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (a) bewirkt $HgCl_2$ (b) starken Rückgang der Fluoreszenz, während NEM (c) weniger effektiv ist. Die geringste Abnahme wird durch PCMS (d) verursacht.

Weiterhin bewirkt die Inkubation mit Thiolblockern eine Zunahme des Zellvolumens (**Abb.3.4.3.1.1.D.**). Ein Kontrollversuch mit $ZnCl_2$ anstelle von $HgCl_2$ bringt keine Volumenänderung und nur geringe Fluoreszenzreduktion. Die zu beobachtende Volumenzunahme liegt somit im thiolreaktiven Charakter dieser Substanzen begründet. - Die Reaktion mit OPT allein führt dagegen zu keiner Volumenerhöhung.

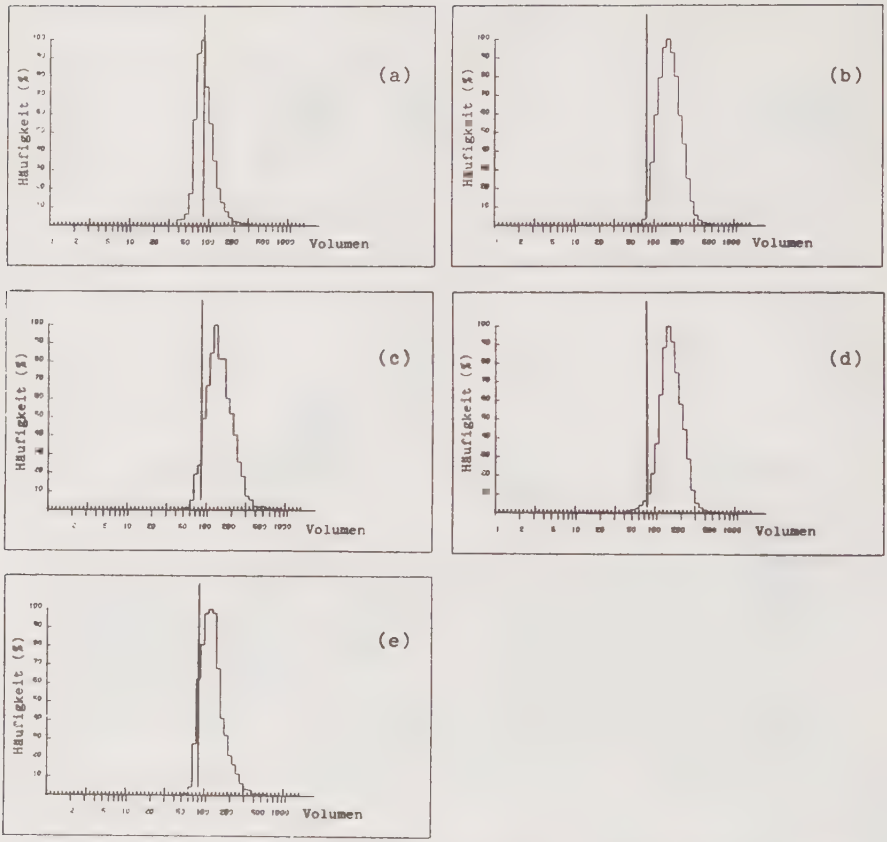


Abb.3.4.3.1.1.D. Einparameter-Histogramme (Volumen): Vergleich verschiedener Thiolblocker. Ehrlich Ascites Tumorzellen werden nach Einwirkung einer thiolreaktiven Substanz (2 mM in HBS, 5 min.) mit OPT gefärbt (1 mM, 5 min.) und durchflußcytometrisch untersucht. **a** Kontrolle, **b** $HgCl_2$, **c** NEM, **d** PCMS, **e** Bromobimane MB. Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung bezüglich des Zellvolumens. Die eingezeichnete Linie dient zur besseren Vergleichbarkeit der Diagramme. - Unter der Einwirkung von Thiolblockern wird eine Zunahme des Zellvolumens gefunden, besonders ausgeprägt bei $HgCl_2$ (**b**) und PCMS (**d**). Ebenso resultiert bereits alleinige Inkubation in dem thiolreaktiven Farbstoff Bromobimane MB (**e**) in einem deutlichen Anstieg des Zellvolumens.

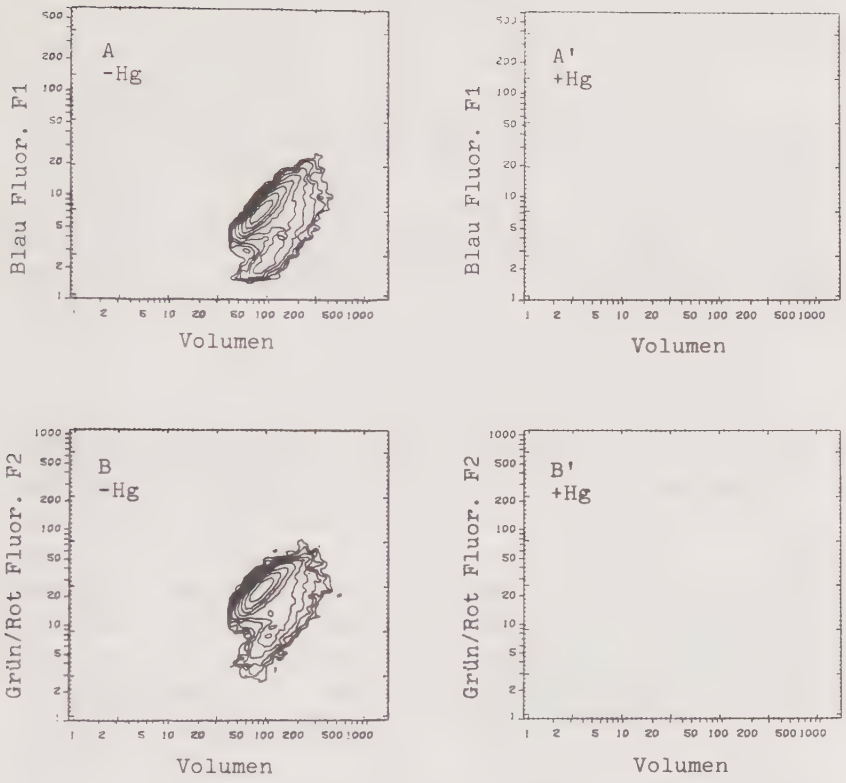


Abb.3.4.3.1.2.A/B Zweiparameter-Histogramme MB-gefärbter Zellen: Wirkung des Thiolblockers $HgCl_2$. Ablauf siehe Abb.3.4.1.1.A/B, mit der Änderung: Farbstoff Bromobimane MB (0.5 mM, 5 min.), Filtersatz: 'Bromobimane', s.2.10.2. Probe: Ehrlich Ascites Tumorzellen. - Die nach MB-Färbung auftretende türkisfarbene Zellfluoreszenz ist in beiden Fluoreszenzlicht-Kanälen (Fl **A**, F2 **B**) meßbar. Inkubation in $HgCl_2$ (4 mM in HBS, 5 min.) vor der MB-Färbung inhibiert die Entwicklung einer Fluoreszenz vollständig (**A',B'**).

3.4.3.1.2. Vergleich mit Bromobimane MB-Färbung

Verwendet man statt OPT den Farbstoff Bromobimane MB, so resultiert eine Inkubation mit Thiolblockern in vollständigem Verlust der gesamten Fluoreszenz. **Abb.3.4.3.1.2.A/B** belegt dies am Beispiel von $HgCl_2$. Im Gegensatz zu OPT reagiert Bromobimane MB somit rein thiolspezifisch und detektiert die Gesamtmenge aller Thiole.

Als Thiolblocker kann aber auch der verwendete Farbstoff selbst wirken: die Bromobimane MB Färbung per se verursacht eine deutliche Volumenzunahme auch ohne vorherige $HgCl_2$-Inkubation (**Abb.3.4.3.1.1.D(e)**); dieser Effekt belegt die thiolblockierenden Eigenschaften der Bromobimane, wodurch prinzipielle Fehler in der Volumenbestimmung verursacht werden.

3.4.3.2. Einsatz von Thioloxidantien

Änderungen des intracelluären GSH-Gehalts werden gezielt durch Thioloxidantien (H_2O_2,tbuOOH,CuOOH,Diamid) herbeigeführt, die entweder spontan (Diamid) oder eher enzymatisch katalysiert (tbuOOH) Thiolgruppen oxidieren. Ob diese Oxidation primär den gesamten Thiolpool oder eher GSH betrifft, hängt von der Spezifität der verwendeten Substanz ab. Außerdem steht GSH über Transhydrogenasen mit den Proteinthiolen im Gleichgewicht, so daß sich Änderungen im GSH-Spiegel auch in deren Oxidationszustand niederschlagen.

3.4.3.2.1. Wirkung auf OPT-Färbung

Am Beispiel einer Inkubation mit 1 mM H_2O_2 wird gezeigt, daß bei anschließender OPT-Färbung die Fluoreszenz im längerwelligen Kanal F2 deutlich abgenommen hat (**Abb.3.4.3.2.1.A**). Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig (**Abb.3.4.3.2.1.B**) und am stärksten im Bereich zwischen 0 bis 1 mM H_2O_2 ausgeprägt. Wird die Färbung vor der H_2O_2-Inkubation durchgeführt, tritt diese Abnahme nicht auf. - Für die hier verwendete Darstellung der Ergebnisse werden die Mittelwerte der fluoreszenten Zellen errechnet und in Abhängigkeit von der H_2O_2-Konzentration aufgetragen; mit dieser Methode lassen sich auch kleinere Änderungen in Fluoreszenz oder Volumen grafisch gut darstellen. - Einen quantitativen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach H_2O_2-Behandlung, nach vollständigem ($HgCl_2$) oder partiellem (PCMS) Thiolblock zeigt **Abb.3.4.3.2.1.C**. Die durch H_2O_2 verursachte Fluoreszenzverringerung liegt zwar deutlich unter der durch

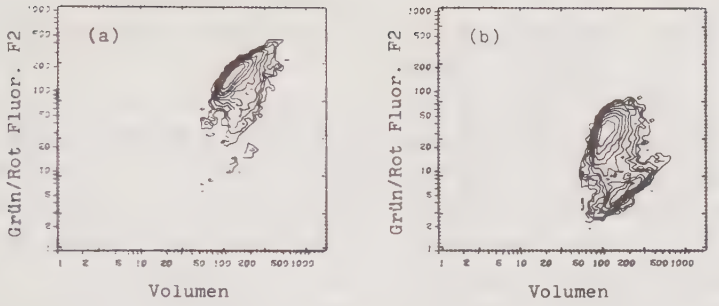


Abb.3.4.3.2.1.A. Wirkung von Thioloxidantien: Im Vergleich zur Kontrolle (a) entwickeln OPT-gefärbte Zellen (EA2P8), die zuvor in H_2O_2 (1 mM in HBS, 5 min.) inkubiert wurden (b), deutlich geringere Fluoreszenzemission. Fitersatz:OPT,s.2.10.2.

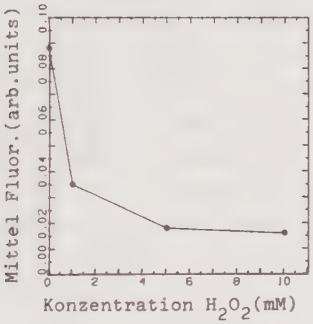


Abb.3.4.3.2.1.B. Wirkung von H_2O_2: Konzentrationsabhängigkeit. Der Ansatz aus Abb.3.4.3.2.1.A. wird mit verschiedenen Dosen H_2O_2 durchgeführt. Mittelwerte der cellulären Fluoreszenzen werden errechnet und gegen die eingesetzte Menge H_2O_2 aufgetragen. Es resultiert Abnahme der Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration des Peroxids, besonders im Bereich 0-1 mM.

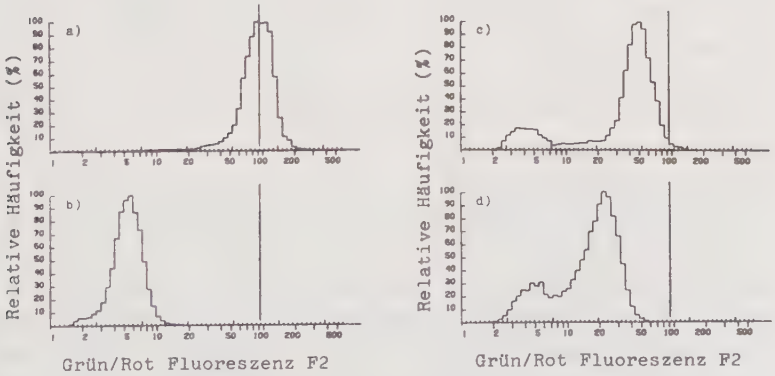


Abb.3.4.3.2.1.C. Vergleich thioloxidierender/-blockierender Agentien. Zweiparameter Histogramme (Fluor.F2) OPT-gefärbter Zellen, vorbehandelt mit: a Kontrolle, b $HgCl_2$, c PCMS, d H_2O_2 (je 1mM).

PCMS-Behandlung verursachten Reduktion, erreicht aber nicht die Abnahme von vollständig thiolblockierten Zellen.

Wird die durch H_2O_2-Präinkubation verursachte Fluoreszenzreduktion in ihrer Kinetik untersucht, so zeigt sich der Haupteffekt innerhalb von 5 Minuten. Danach wird nur noch mäßige Abnahme beobachtet (**Abb.3.4.3.2.1.D**). Im Vergleich dazu zeigt tbuOOH, ebenfalls ein Substrat der GSH-Px, eine andere Wirkung: auch diese Substanz verursacht eine Abnahme der Fluoreszenz in der OPT-Färbung; diese verläuft aber langsamer, und die Effizienz ist geringer als die von H_2O_2.

In einem weiteren Versuch wird die Kurzzeiteinwirkung von Peroxiden auf Auswirkungen im GSH-Spiegel untersucht. Dazu wird der GSH-Gehalt von intakten Zellen durch einen kurzen, aber intensiven oxidativen Streß mittels Inkubation in 10 mM tbuOOH abgesenkt. Nach 5 Minuten wird das Peroxid ausgewaschen, und die Zellen werden in glucosehaltiges RPMI-Medium bei 37 ^{o}C überführt. Erfolgt dann Entnahme von Aliquots mit anschließender OPT-Färbung, so kann die Regeneration des GSH als Anstieg der Fluoreszenz gut verfolgt werden (**Abb.3.4.3.2.1.E**).

Auch das eher unspezifische Thioloxidans Diamide verursacht eine Verringerung der OPT-Fluoreszenz, allerdings nicht mit derselben Effizienz wie H_2O_2; einen quantitativen Vergleich der Thioloxidantien in 2 mM Konzentration und nach 5 Min. Inkubationszeit zeigt **Abb.3.4.3.2.1.F.**

3.4.3.2.2. Vergleich mit Bromobimane MB- und ADB-Färbung

Abb.3.4.3.2.2. zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von OPT-, ADB/PI- und Bromobimane MB-Färbung nach vorheriger oxidativer Belastung der Zellen, wie sie durch Inkubation in H_2O_2 oder Diamid verursacht wird. Dabei ergeben die einzelnen Färbungen deutliche Unterschiede: nach H_2O_2-Inkubation reagieren OPT-gefärbte Zellen sehr ausgeprägt,

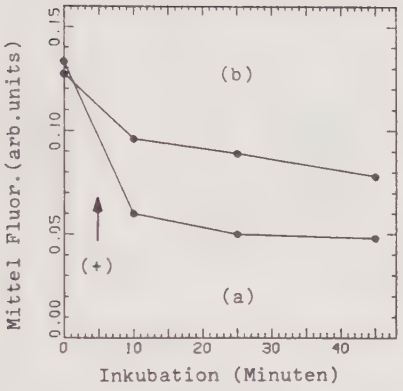


Abb.3.4.3.2.1.D. Kinetik der Peroxidwirkung. Einem Inkubationsansatz werden vor bzw. nach Zugabe (+) von Peroxid (5 mM in HBS) Zellen entnommen, mit OPT gefärbt und im Mittelwert der Fluoreszenz F2 gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. - In der Anfangsphase verringert sich die Fluoreszenz ausgeprägt, um dann nur noch moderat abzunehmen. Verglichen mit H_2O_2 (a) erweist sich tbuOOH (b) als weniger wirksam.

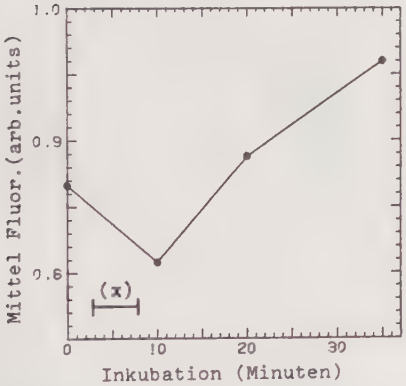


Abb.3.4.3.2.1.E. Erholungskinetik. Frisch entnommene Ehrlich Ascites Zellen werden nach Inkubation in tbuOOH (10 mM in HBS, 5 min.) zweimal in RPMI gewaschen und bei 37°C inkubiert. Wiederholt werden Aliquots entnommen, mit OPT gefärbt und in der mittleren Fluoreszenz F2 gegen die Zeit aufgetragen. - Nach der durch Peroxid verursachten Abnahme der Fluoreszenz wird eine Zunahme bis über den Ausgangswert gemessen.

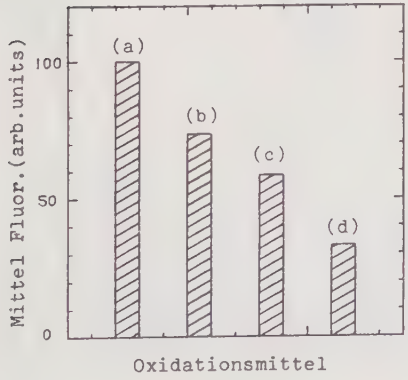


Abb.3.4.3.2.1.F. Vergleich verschiedener Thioloxidantien. Zellen (EA2P8) werden mit Oxidationsmittel (2 mM in HBS, 5 min.) behandelt und in OPT gefärbt. Dargestellt wird die Abnahme der mittleren Fluoreszenz F2, bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle (a) als Referenz. Oxidantien: b tbuOOH, c Diamide, d H_2O_2. - Im Vergleich erweist sich letztere als die reaktivste Substanz.

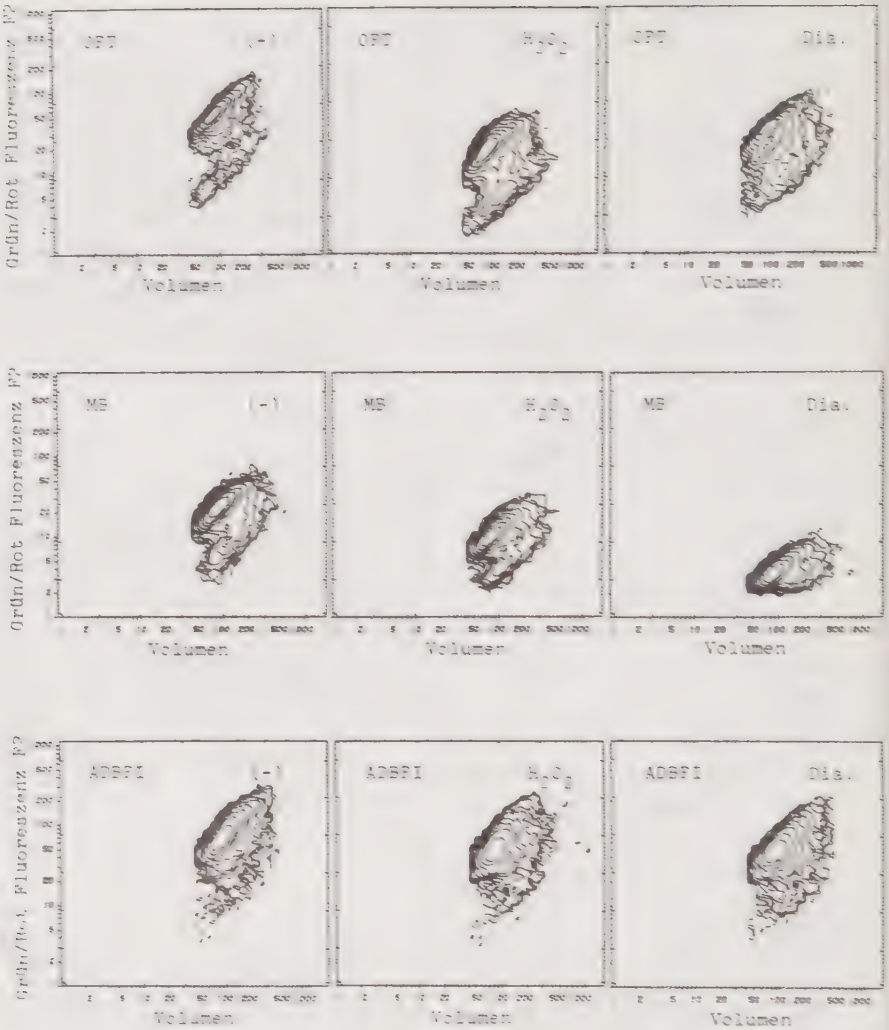


Abb.3.4.3.2.2. Vergleich funktionell unterschiedlicher Färbungen: Reaktion auf Thioloxidantien. Tumorzellen (EA2P8) werden vor bzw. nach Behandlung mit H_2O_2 oder Diamide (je 2 mM in HBS, 5 min.) in drei getrennten Ansätzen gefärbt: **OPT** (0.5 mM), **MB** (Bromobimane MB 0.5 mM), **ADBPI** (ADB 60 µM + PI 60 µM). Messung erfolgt unter Verwendung verschiedener Filtersätze. s.2.10.2. Dargestellt sind Zweiparameter Histogramme (FI Grün/FI Rot). - Deutlich verringerte Fluoreszenzentwicklung tritt auf bei der Kombination H_2O_2/OPT und im Fall von Diamide/Bromobimane MB. Nach ADB-PI Färbung sind nur geringe Unterschiede sichtbar.

während Diamid nur einen gemäßigten Rückgang der Fluoreszenz zur Folge hat. Anders verhält es sich im Fall der Bromobimane MB-Färbung: hier hat das unspezifisch thioloxidierende Diamid den stärksten Effekt, während H_2O_2 weniger Wirkung zeigt. Bei der ADB/PI-Färbung resultiert oxidativer Streß in beiden Fällen in einem nur geringen Rückgang der Fluoreszenz. Diese Messungen zeigen, daß die unterschiedlichen Färbungen verschiedene Aussagen liefern: während OPT eher die durch H_2O_2 verursachten Änderungen im GSH-Status detektiert, erfaßt Bromobimane MB die Gesamtmenge aller Thiole. Zellvitalität und intracelluläre Esteraseaktivität bleiben durch einen kurzen oxidativen Streß nahezu unbeeinflußt.

3.4.3.3. Wirkung von Enzyminhibitoren des GSH-Zyklus

Mit Hilfe von Substanzen, die spezifisch Enzyme des GSH-Zyklus hemmen, lassen sich sehr gezielt Änderungen im Glutathion-Status intakter Zellen verursachen; nachteilig ist die dafür benötigte längere Inkubationszeit, in der sich die Änderung auch anderen Molekülen (z.B. Proteinthiolen) mitteilt. Als Inhibitoren werden verwendet: a) BCNU, ein irreversibler Inhibitor der GSSG-Reduktase und b) BSO, ein Blocker der GSH-Synthese.

Werden Zellen mit BCNU-Dosen von 9 µM bis 0.9 mM inkubiert, so zeigen sie bei der nachfolgenden OPT-Färbung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konzentrationsabhängig Fluoreszenzreduktion (**Abb.3.4.3.3.A**). Dieser Effekt tritt schon nach wenigen Minuten ein, bei längeren Inkubationszeiten (> 5 h) läßt sich damit die Anwesenheit von 10 µM BCNU nachweisen.

Abb.3.4.3.3.B zeigt einen Vergleich von verschiedenen BCNU-Derivaten in ihrer Wirkung auf die F2-Fluoreszenz. Diese Verbindungen haben unterschiedliches Alkylierungs- und Carbamoylierungspotential und unterscheiden sich in der

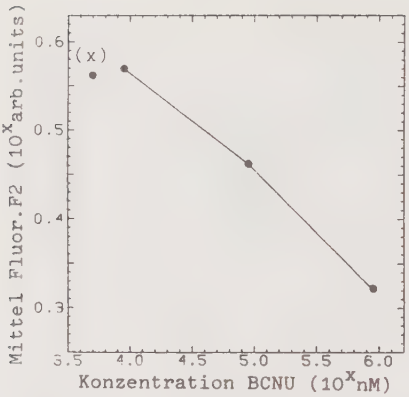


Abb.3.4.3.3.A Einfluß von BCNU. Nach Einwirkung von BCNU (9 - 90 - 900 µM in RPMI, 5 h, 37°C) und anschliessender OPT-Färbung weisen Zellen dosisabhängig im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**x**) geringere Fluoreszenz auf. - Logarithmische Darstellung der F2-Mittelwerte und Konzentrationen.

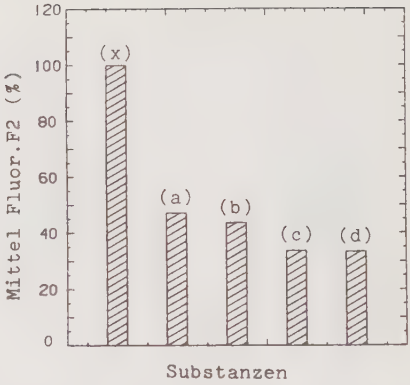


Abb.3.4.3.3.B Vergleich der BCNU-Derivate. P3b6-Zellen werden in BCNU-Derivaten (1mM, TBS, 10 min) inkubiert und OPT-gefärbt. Dargestellt sind F2-Mittelwerte, Referenz ist eine unbehandelte Kontrolle (**x**). Merkmal der Substanzen (**a** BCNU, **b** HeCCNU, **c** CCNU, **d** MeCCNU) ist eine ausgeprägte Verringerung der F2-Fluoreszenz.

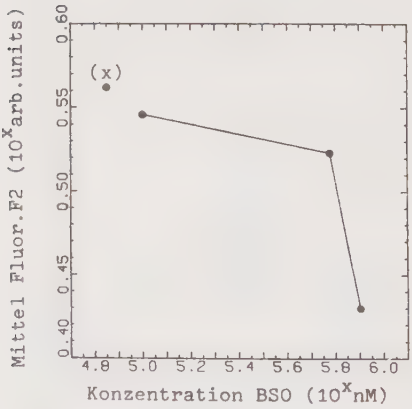


Abb.3.4.3.3.C Einfluß von BSO. EA2P8 Zellen werden 5 h in BSO (0.1 - 0.6 - 0.8mM in RPMI, 37°C) inkubiert und anschliessend OPT-gefärbt. Logarithmische Auftragung der mittleren F2-Fluoreszenz gegen BSO-Konzentration, (**x**) unbehandelte Kontrolle. - Deutliche Fluoreszenzreduktion wird nur bei höchster Dosierung (0.8 mM) beobachtet.

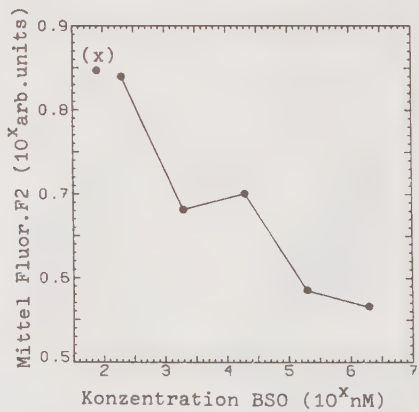


Abb.3.4.3.3.D Einfluß von BSO, wie Abb.3.4.3.3.C, aber längere Inkubationszeit (9 h). Eingesetzte BSO-Konzentrationen: 0.2 - 2 - 20µM - 0.2 - 2mM. Bei fortgesetzter Einwirkung verursachen bereits geringere Dosierungen (2 - 20 µM BSO) eine Fluoreszenzabnahme.

Polarität der Seitenkette. Allen gemeinsam ist ein deutliches Absenken der OPT-Fluoreszenz.

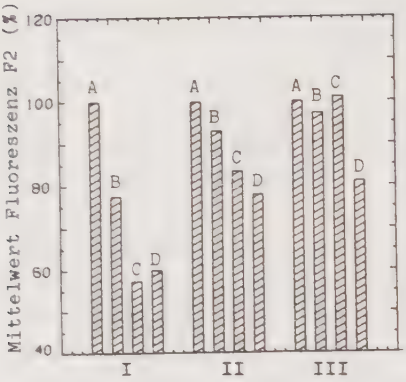
Auch die Anwendung von BSO in Konzentrationen von 1 µM bis über 1 mM verursacht eine GSH-Abnahme, was nach OPT-Färbung in einem Rückgang der F2-Fluoreszenz resultiert. **Abb.3.4.3.3.C** zeigt die Ergebnisse nach 5 h Inkubationszeit. Auffallend ist die im Vergleich zu BCNU geringere Effizienz von BSO, was sich jedoch nach Verlängerung der Inkubationsdauer ändert (**Abb.3.4.3.3.D**). Bei ausreichend langer Einwirkzeit erzielen auch geringe BSO Konzentrationen eine deutliche Abnahme der OPT-Fluoreszenz.

Die Kombination beider Substanzen wirkt synergistisch, was sich gut am Übergang von hoher zu niedriger Dosierung demonstrieren läßt (**Abb.3.4.3.3.E**): Die bei höheren Dosen (I,II) durch die Einzelsubstanzen verursachte Abnahme der OPT-Fluoreszenz verschwindet bei niedriger Dosis vollständig, während die Kombination der Substanzen auch in geringer Konzentration eine deutliche Verringerung verursacht, die nicht mehr als Summe der Einzeleffekte (III D) erklärt werden kann.

3.4.3.4 Weitere Beeinflussungen des Thiol/GSH-Spiegels

Änderungen des GSH/Thiolstatus können verursacht werden im Sinne einer gesteigerten Synthese (Inkubation mit GSH-Precursoren), einer erleichterten Regeneration des GSH (Glucoseinkubation) oder durch Oxidation mittels ionisierender Strahlung. Im folgenden werden die Auswirkungen solcher Vorbehandlung auf das Ergebnis der OPT-Färbung beschrieben.

Inkubation von CHO-Zellen in 0.4 mM Cysteamin führt in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zu einer Zunahme der längerwelligen F2-Fluoreszenz; dieser Effekt ist zwar schwach ausgeprägt, läßt sich aber durch eine Modifikation der Standardauswertung detektieren. Dazu wird nur diejenige



	I		II		III	
	BSO	BCNU	BSO	BCNU	BSO	BCNU
A	-	-	-	-	-	-
B	0.8mM	-	0.6mM	-	0.1mM	-
C	-	1.0mM	-	0.1mM	-	10µM
D	0.8mM	+1.0mM	0.6mM	+0.1mM	0.1mM	+10µM

Abb.3.4.3.3.E Synergismus BSO/BCNU. EA2P8 Zellen werden in drei Ansätzen (I,II,III) laut Schema inkubiert (RPMI, 37°C, 5 h), in HBS gewaschen und mit OPT gefärbt. - In niedrigen Dosen (III) wird durch die Einzelsubstanzen (B,C) keine Fluoreszenzabnahme verursacht, wohl aber im Fall der Kombination (D).

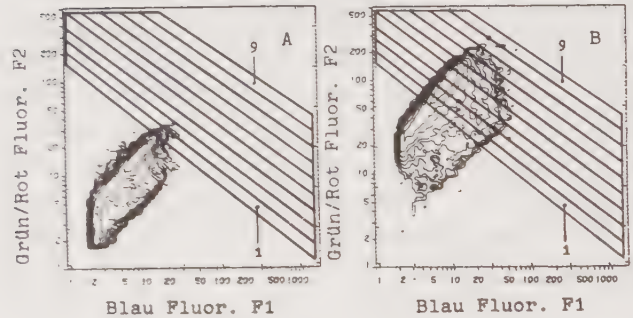


Abb.3.4.3.4.A/B Fenster. **A** Zellen mit $HgCl_2$ (4mM) inkubiert, OPT-gefärbt. Fenster in F2/F1-Diagramm definieren, sodaß nur wenig Zellen erfaßt sind. **B** Wie A, ohne $HgCl_2$. Die Verteilung auf die Fenster ist jetzt eine Funktion der thiolspezifischen Fluoreszenz.

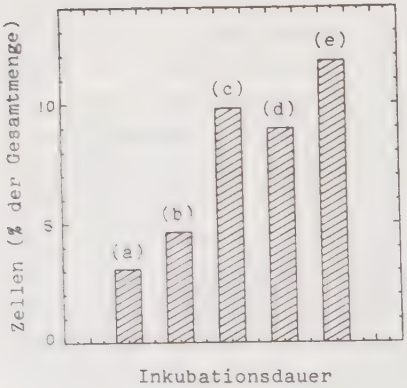


Abb.3.4.3.4.C Wirkung von Cysteamin. Zellen (CHO-Kultur) werden mit Cysteamin inkubiert (0.4 mM in McCoy-Medium, 37°C). Regelmäßig wird ein Aliquot entnommen, in HBS gewaschen, mit OPT (1 mM) gefärbt und per Durchflußcytometer analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen, die aufgrund ihrer Fluoreszenz in einem definierten Bereich hoher Fluoreszenz (Fenster 7, s.Abb.3.4.3.4.A/B) angetroffen werden. - Mit zunehmender Inkubationsdauer (**a** 0, **b** 30, **c** 60, **d** 90, **e** 120 Minuten) erhöht sich die Anzahl hochfluoreszenter Zellen.

Fluoreszenz berücksichtigt, die tatsächlich aus der Bindung von OPT an thiolhaltige Moleküle (und damit an GSH) stammt: in einem Ansatz mit $HgCl_2$-behandelten Zellen werden meßtechnisch "Fenster" so definiert, daß nur wenige Zellen darin erscheinen (**Abb.3.4.3.4.A**); in einem Parallelansatz ohne $HgCl_2$ verteilen sie sich jetzt nach ihrer jeweiligen GSH/Thiolfluoreszenz und werden rechnerisch erfaßt (**Abb.3.4.3.4.B**). Damit stellt dieses Verfahren eine Subtraktion der unspezifischen OPT-Fluoreszenz von der Gesamtfluoreszenz dar, wobei je nach Fenster zwischen hoch- und niederfluoreszenten Zellen unterschieden wird. Trägt man die Häufigkeitsverteilung eines solchen hochfluoreszenten Fensters in Abhängigkeit von der Verweildauer in Cysteamin auf, so wird **Abb.3.4.3.4.C** erhalten: die OPT-Fluoreszenz steigt mit zunehmender Inkubationsdauer an.

Auch Methionin (1 mM im Inkubationsansatz) bewirkt eine Zunahme an hochfluoreszenten Zellen (**Abb.3.4.3.4.D**); dieses Verhalten ist am deutlichsten an Material von Zellkulturen zu beobachten, die unmittelbar zuvor gesplittet wurden. Anschließender H_2O_2-Streß (2 mM) reduziert die Fluoreszenz wieder auf einen Wert, der in der Kontrolle ohne Methionin erreicht wird.

In einem weiteren Versuch werden Zellen 15 Minuten lang bei 37°C in TBS mit 5 mM Glucose inkubiert. **Abb.3.4.3.4.E** zeigt eine Häufigkeitsverteilung dieser Zellen nach ihrer OPT-Fluoreszenz, im Vergleich dazu ein glucosefreier Ansatz: Anwesenheit von Glucose erhöht die Anzahl höherfluoreszenter Zellen. Dieser Effekt hängt stark ab von der Vorbehandlung der Zellen (Mediumwechsel, Trypsinieren usw.).

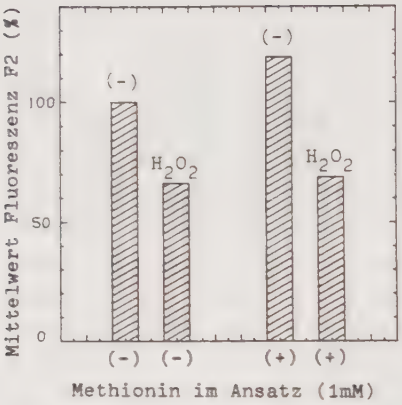


Abb.3.4.3.4.D Wirkung von Methionin. In zwei Ansätzen werden Zellen (P3b6) mit (+) bzw. ohne (-) Methionin (1 mM in RPMI, 4 h, 37°C) inkubiert und in HBS gewaschen, dann vor (-) bzw. nach Inkubation in H_2O_2 (2 mM in HBS) mit OPT gefärbt. Darstellung: Mittlere Fluoreszenz F2, auf jeweils unbehandelte Kontrolle standardisiert. - Anwesenheit von Methionin (+) resultiert in höherer Fluoreszenz, nicht jedoch bei Zusatz von H_2O_2.

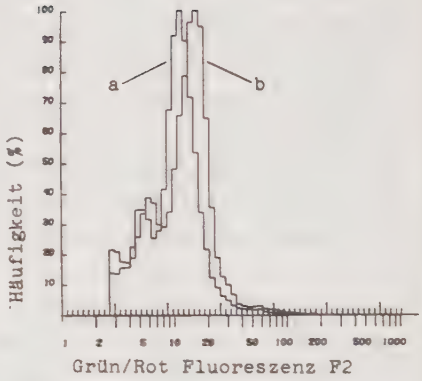


Abb.3.4.3.4.E Wirkung von Glucose. Zellen (P3b6) werden 15 min. in TBS mit Glucose (5 mM, 37°C) inkubiert. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne Glucose. Färbung mit OPT (1 mM). Darstellung: Häufigkeitsverteilung Fluoreszenz F2, beide Ansätze übereinandergezeichnet. - Im Vergleich zur Kontrolle (a) weisen Glucose-substituierte Zellen (b) durchgehend höhere Fluoreszenzintensitäten auf.

3.4.4. Korrelation zwischen OPT-Färbung und konventioneller GSH-Bestimmung

Bereits in HPLC-Analysen von Lysaten aus OPT-gefärbten Zellen wurde gemessen, daß OPT auch an Proteine fluoreszent bindet. Hier wird untersucht, inwieweit durchflußcytometrische Bestimmungen der Fluoreszenz von intakten, OPT-gefärbten Zellen korreliert werden können mit Glutathion-Bestimmungen, die auf konventionelle Weise aus deproteinierten Zell-Homogenaten erhalten werden.

3.4.4.1. Messung nach Cysteamin-Inkubation

Inkubation von exponentiell wachsenden CHO-Zellen in McCoy-Medium unter Zusatz von 0.4 mM Cysteamin resultiert zeitabhängig in einer Zunahme an reduziertem GSH, was mit Hilfe von enzymatischen Standard-GSH-Assays (2.6.2.,2.6.3.) gemessen wird (**Abb.3.4.4.1.**). Die parallel durchgeführte durchflußcytometrische Messung dieser Zellen liefert bis auf einen Wert eine sehr gute Korrelation. Die Aussage liegt in der Übereinstimmung der Profile beider Messungen; dabei ist anzumerken, daß hier eine Absolutmessung (nM GSH/mg Protein) mit einer Relativmessung (Zunahme der OPT-Fluoreszenz, gemessen im Durchflußcytometer) verglichen wird.

3.4.4.2. Messung nach Peroxid-Inkubation

Eine Abnahme der cellulären GSH-Konzentration nach Einwirkung von Peroxiden (H_2O_2, tbuOOH) wird im proteinfreien Zellhomogenat per Fluoreszenz-GSH-Assay mit OPT-Färbung nachgewiesen (**Abb.3.4.4.2.A/B**). Die zur gleichen Zeit durchgeführte Messung intakter Zellen im Durchflußcytometer ergibt übereinstimmendes Profil; dies gilt für das organische tbuOOH (**Abb.3.4.4.2.A**) gleichermaßen wie für H_2O_2 (**Abb.3.4.4.2.B**).

Änderungen im GSH-Gehalt können somit in der Durchflußcytometrie detektiert werden und sind mit den Ergebnissen der Homogenatsmethoden gut korrelierbar.

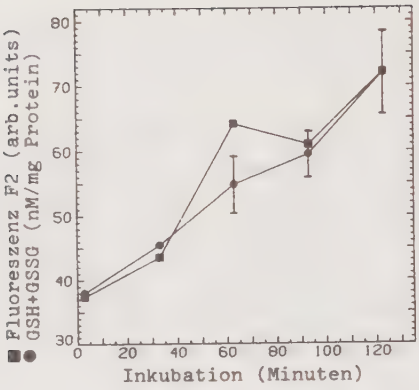


Abb.3.4.4.1. Korrelationsversuch. Einem Ansatz von Zellen (CHO) in Cysteamin (0.4 mM in McCoy Medium, 37°C) wird je 30 Minuten ein Aliquot entnommen, in HBS gewaschen und auf Änderungen des Glutathiongehalts hin untersucht: (●) nach Homogenisation und Proteinfällung durch Farbreaktion mit DTNB (s.2.6.3.) mit gleichzeitiger Proteinbestimmung, (■) durch OPT- Färbung und durchflußcytometrische Analyse. Darstellung der Ergebnisprofile beider Meßmethoden. - Fortgesetzte Cysteamin-Behandlung resultiert im Anstieg des cellulären Glutathiongehalts, korrelierbar mit einer Zunahme der OPT-Fluoreszenz.

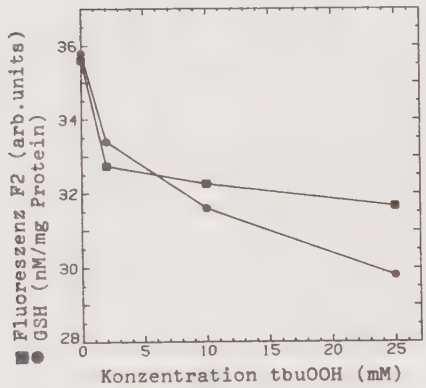


Abb.3.4.4.2.A Korrelationsversuch. Zellen (EA2P8) werden unterschiedlichen Dosen tbuOOH ausgesetzt (0-25 mM in HBS, 5 min.), in HBS gewaschen und mit zwei verschiedenen Methoden untersucht: (●) Bestimmung des GSH-Gehalts nach Homogenisation und Proteinfällung durch Anfärbung mit OPT (s.2.6.2.) mit gleichzeitiger Proteinbestimmung, (■) durchflußcytometrische Analyse ganzer, OPT-gefärbter Zellen. - Anwendung von tbuOOH verursacht dosisabhängig verringerte Fluoreszenzentwicklung mit OPT, wobei die Profile beider Meßmethoden korrelieren.

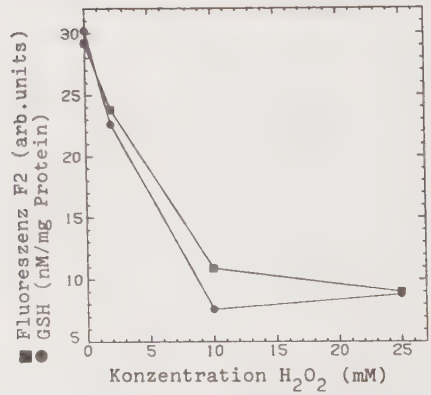


Abb.3.4.4.2.B Korrelationsversuch. Wie in Abb.3.4.4.2.A. beschrieben, aber unter Verwendung von H_2O_2 als GSH-absenkendes Peroxid. - Die durch H_2O_2 verursachte GSH-Oxidation läßt sich mit OPT im deproteinierten Zellhomogenat (●) gleichermaßen nachweisen wie in der durchflußcytometrischen Analyse ganzer, intakter Zellen (■). Gute Korrelation der Meßergebnisse beider Methoden ist zu beobachten.

3.4.5. Wirkung von Chemotherapeutika auf das Ergebnis der OPT-Färbung

Wie am Beispiel des BCNU ersichtlich (s.Abb.3.4.3.3.A), können zur Tumortherapie verwendete Chemotherapeutika sehr deutliche Änderungen im GSH-Status bewirken. Hier wird untersucht, welche Effekte andere klinisch verwendete Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in Zellen nach OPT-Färbung verursachen.

Abb.3.4.5. zeigt das Ergebnis einer 48 h Inkubation von P3B6-Zellen in vier verschiedenen Therapeutika. Es werden jeweils drei Konzentrationen verwendet (1/2/3), wobei die mittlere Dosis der in der Therapie im Organismus erreichbaren Konzentration entspricht; zusätzlich wird die 10-fache und 0.1-fache Dosis eingesetzt. Als Kontrolle dienen drei Ansätze ohne cytostatische Behandlung. Die Auswertung geschieht nach dem in Abb.3.4.3.4.A/B beschriebenen Verfahren; es wird damit eine Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit von der Fluoreszenz erhalten. - Deutlich erkennbar weisen die Kontrollen sehr einheitliche Charakteristik auf, wobei die Mehrheit der Zellen hohe OPT-Fluoreszenz besitzt. BCNU verursacht dosisabhängig einen Rückgang an hochfluoreszenten Zellen, wie bereits in 3.4.3.3. beschrieben ist. Ähnliche Resultate werden mit der alkylierenden Substanz Endoxan (Cyclophosphamid) erhalten, während die Wirkung von Adriblastin (Doxorubicin) und Vincristin auf die Verteilung der OPT-fluoreszenten Zellen gering ausgeprägt ist. Da auch diese Substanzen (besonders in höherer Konzentration) die Zellen schädigen, zugleich sich aber die Charakteristik der Fluoreszenzverteilung kaum ändert, wird eine unmittelbare Beeinflussung des GSH-Zyklus als Wirkprinzip dieser Chemotherapeutika ausgeschlossen.

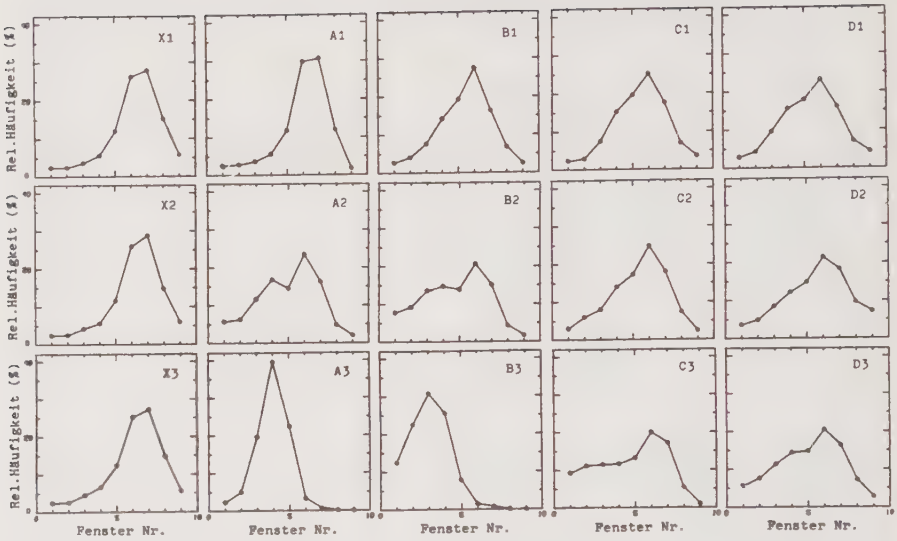


Abb.3.4.5. Cytostatischer Ansatz. Zellen (P3b6) werden 48 h in RPMI unter Zusatz von Cytostatika inkubiert (s.2.3.3.), in TBS gewaschen und mit OPT gefärbt. Zur Auswertung der durchflußcytometrischen Daten werden Fenster definiert (s.Abb.3.4.3.4.A/B.). Dargestellt ist die relative Zellzahl je Fenster. Cytostatika:

A	BCNU	**B**	Endoxan	**C**	Adriblastin	**D**	Vincristin
1	2.3µM	**1**	7.7µM	**1**	0.2µM	**1**	1.2nM
2	23.0µM	**2**	77.0µM	**2**	2.0µM	**2**	12.0nM
3	230.0µM	**3**	777.0µM	**3**	20.0µM	**3**	120.0nM

Kontrollen sind drei getrennte Ansätze ohne Cytostatika (**X1**, **X2**, **X3**). - Dosisabhängige Änderungen im Profil infolge verringerter Fluoreszenz (=Abwandern in Fenster mit kleinerer Nummer) werden bei BCNU (**A**) und Endoxan (**B**) beobachtet. Keine Veränderungen ergeben sich unter Vincristin (**D**).

3.4.6. Effekt von PZ51 (Ebselen)

PZ51 ist ein niedermolekulares Benzoisoselenazol-Derivat mit Peroxidaseaktivität. Mit Hilfe der Durchflußcytometrie wird untersucht, welche Wirkung die Substanz allein bzw. in Kombination mit Peroxiden an intakten Zellen verursacht.

Abb.3.4.6.A gibt Ergebnisse einer derartigen Inkubation wieder (EA2P8 Zellen, PZ51, Peroxid tbuOOH). Es zeigt sich, daß Peroxidaseaktivität kaum nach OPT-, sondern eher nach MB-Färbung beobachtet wird: zwar senkt die Anwesenheit von 5 mM tbuOOH per se die Fluoreszenz, jedoch wird durch PZ51 weitere Reduktion verursacht. Die alleinige Inkubation in 30 µM PZ bewirkt einen Rückgang der MB-Fluoreszenz, kaum jedoch der OPT-Fluoreszenz. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß PZ51 zwar Thiolperoxidase Aktivität besitzt, aber keine hohe Spezifität für GSH aufweist.

Wird in dem Versuch tbuOOH (5 mM) durch das Oxidationsmittel H_2O_2 (5 mM) ersetzt, so verringert sich die meßbare Peroxidaseaktivität, da H_2O_2 per se schon sehr starke Fluoreszenzreduktion verursacht, die durch 30 µM PZ51 kaum noch verstärkt wird.

Ein anderes Merkmal der Wirkung von PZ51 auf EA2P8-Zellen ist eine deutliche Volumenzunahme, die schon bei Konzentrationen ab 10 µM nach kurzer Zeit eintritt; unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen (30 µM PZ51) wird nach 30 Minuten ein Maximum in der Volumenzunahme etwa um den Faktor 2 erzielt (**Abb.3.4.6.B**).

Interessanterweise reagiert PZ51 mit verschiedenen Zelltypen in einem sehr unterschiedlichen Muster (siehe 3.4.7); so werden Tumorzellen durch die Substanz wesentlich stärker beeinflußt als etwa Lymphocyten. Letztere wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in den bisherigen Ergebnis-Darstellungen rechnerisch abgetrennt.

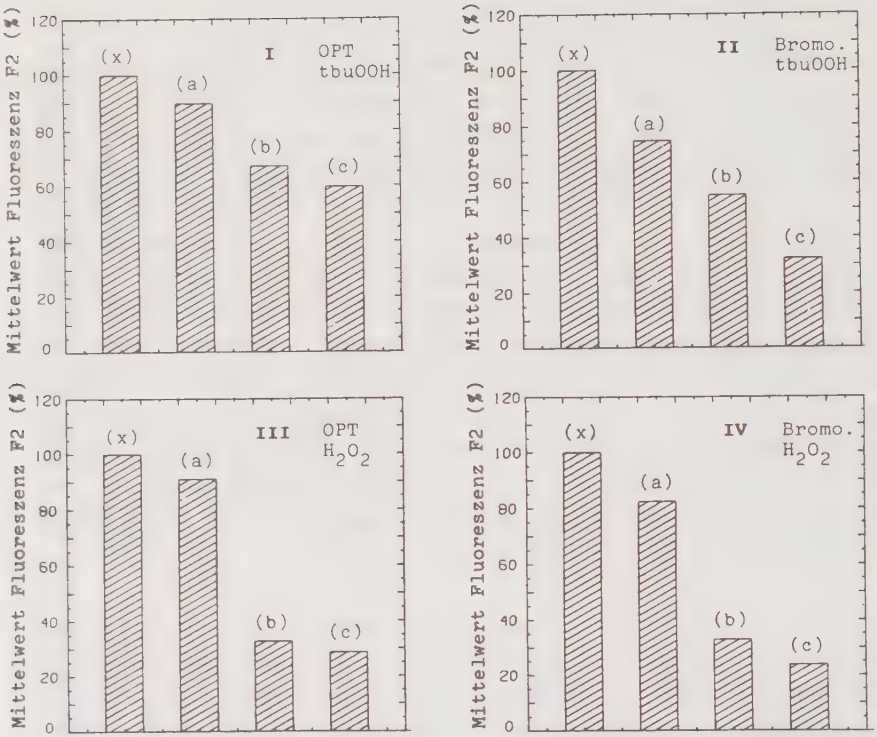


Abb.3.4.6.A Peroxidase-Aktivität von PZ51. EA2P8 Tumorzellen werden in HBS je 5 Minuten inkubiert mit: **a** PZ51 (30 µM), **b** Peroxid (5 mM tbuOOH bzw. H_2O_2), **c** Kombination aus a/b (30 µM/5 mM), anschliessende Färbung mit OPT bzw. Bromobimane MB (0.5 mM). Dargestellt sind Mittelwerte der Fluoreszenz F2, bezogen auf eine unbehandelte, gefärbte Kontrolle (**x**). - PZ51 verursacht per se Abnahme der Fluoreszenz bei Bromobimane Färbung (IIa), geringerer Effekt mit OPT (Ia). Die Kombination (**c**) ist wirksamer als die Einzelkomponenten im Fall von MB (II), aber nicht nach OPT (I). Einsatz von H_2O_2 (III,IV) resultiert stets in starkem Fluoreszenzverlust (**b**), keine Steigerung in Kombination mit PZ51 (**c**) mehr möglich.

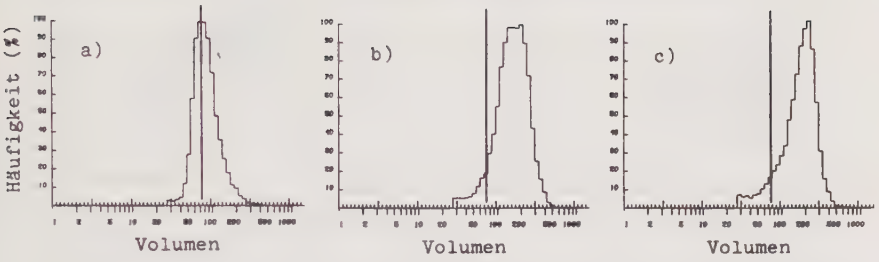


Abb.3.4.6.B Wirkung von PZ51. Tumorzellen (EA2P8) werden mit PZ51 behandelt (30 µM, HBS). Nach verschiedenen Zeiten (a 3, b 20, c 30 min.) wird ein Aliquot entnommen und mit OPT gefärbt. Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung des Zellvolumens. - Anwesenheit von PZ51 verursacht bei EA2P8 Zellen zeitabhängig eine Zunahme des Zellvolumens, auch ohne Zusatz von Peroxid.

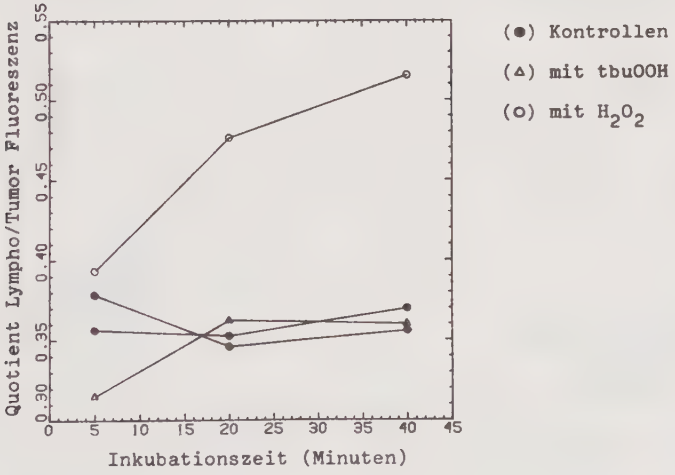


Abb.3.4.7.A Zelltyp-spezifische Wirkung von Peroxiden. Einem Inkubationsansatz von Zellen (EA2P8) und Peroxid (tbuOOH bzw. H_2O_2 5mM, HBS, 4°C) werden wiederholt Aliquots entnommen, OPT-gefärbt (0.1 mM) und durchflußcytometrisch analysiert. Darstellung: Quotient der mittleren Fluoreszenzen von Lymphocyten bzw. Tumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. - Nur geringe Änderungen im Quotienten werden durch tbuOOH verursacht, dagegen resultiert H_2O_2-Behandlung in deutlichem Anstieg: die Fluoreszenz von Tumorzellen nimmt während der Inkubation überproportional stärker ab als die der Lymphocyten.

3.4.7. Unterschiede zwischen Tumorzellen und Lymphocyten

Basis für diese Untersuchungen ist die Fähigkeit der Durchflußcytometrie, mehrere in einem Ansatz vorkommende Zelltypen in ihren Eigenschaften gleichzeitig zu erfassen. EA2P8 Ascites Zellen, die sich aus Tumorzellen und Lymphocyten zusammensetzen, reagieren auf Peroxidstreß uneinheitlich: **Abb.3.4.7.A** zeigt das Resultat einer solchen Messung, wobei aus den Mittelwerten der Fluoreszenzen von Lymphocyten und Tumorzellen der Quotient gebildet und in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen wird. Würden beide Zelltypen gleichermaßen durch die Inkubation in H_2O_2 bzw. tbuOOH betroffen, so bliebe der Quotient konstant, wie dies bei den Kontrollen der Fall ist. Tatsächlich reduziert sich jedoch während der H_2O_2-Inkubation die Fluoreszenz der Tumorzellen überproportional, was in einem Anstieg des Quotienten resultiert.

Eine sehr unterschiedliche Reaktion beider Zelltypen bezüglich Fluoreszenz und Volumen wird beobachtet, wenn eine EA2P8 Zellsuspension zunächst mit 30 µM PZ51 inkubiert und dann OPT-gefärbt wird. Während die größeren Tumorzellen im Laufe der Inkubationsdauer deutlich an Fluoreszenz verlieren und zugleich im Volumen zunehmen, bleiben die kleineren Lymphocyten in beiden Meßparametern nahezu unverändert **(Abb.3.4.7.B)**.

Die Wiederholung dieser Versuche mit anderem Zellmaterial (Knochenmark Ratte, diverse Experimentaltumoren) zeigt, daß Zellen in PZ51-sensitive und insensitive Typen unterteilt werden können. Als PZ51-sensitiv (Fluoreszenzverlust, Volumenzunahme) erweisen sich Yoshida-Sarkom Zellen (Ratte), während Zajdela-Ascites Zellen und Knochenmarkszellen (beide Ratte) durch PZ51 nicht beeinflußt werden.

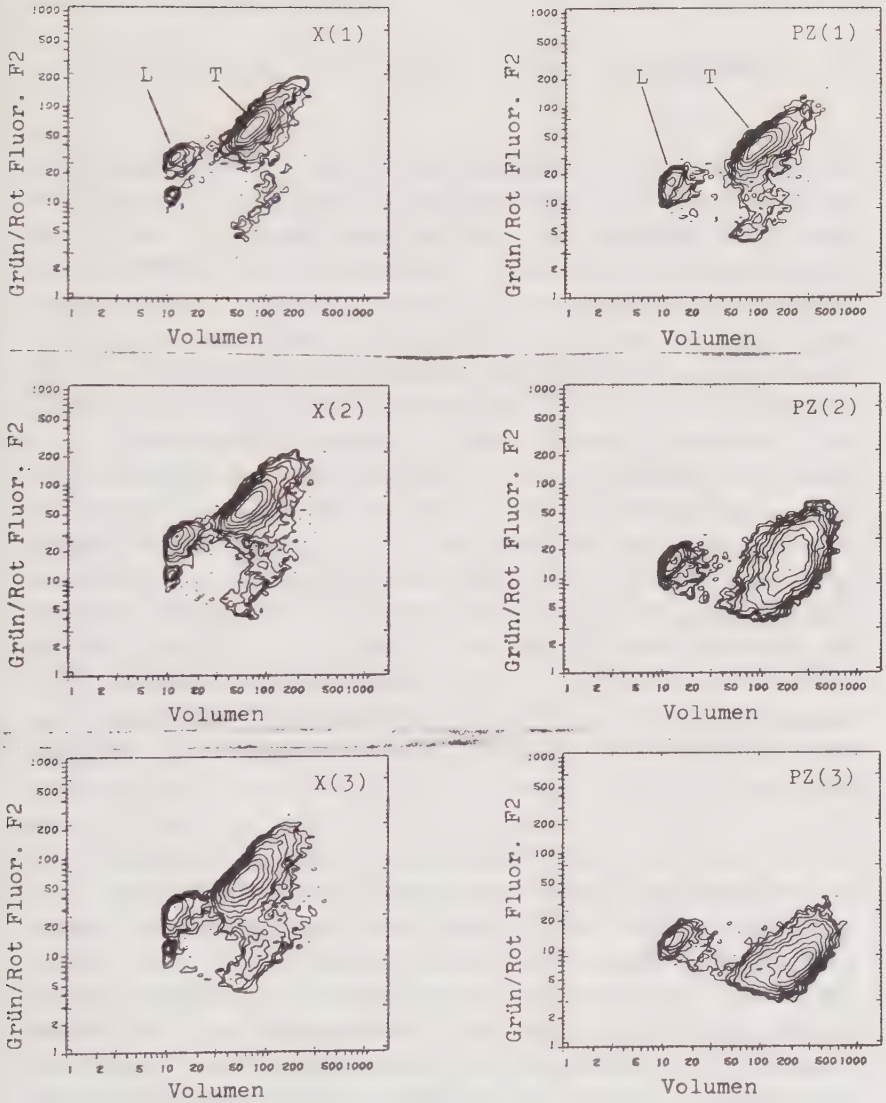


Abb.3.4.7.B Zelltyp-spezifische Wirkung von PZ51. Einem Inkubationsansatz von Zellen (EA2P8) und PZ51 (30 µM, 4°C) werden mehrmals (**1** 3, **2** 20, **3** 35 min.) Aliquots entnommen und mit OPT · (0.5 mM) gefärbt. Darstellung der durchflußcytometrischen Daten als F2/V - Diagramme. - Im Gegensatz zur Kontrolle (**X**) weisen Tumorzellen (**T**) im PZ51-haltigen Ansatz (**PZ**) mit zunehmender Inkubationsdauer verringerte Fluoreszenz auf, begleitet von deutlicher Volumenzunahme. Im gleichen Ansatz vorhandene Lymphocyten (**L**) werden dagegen kaum beeinflußt.

4. DISKUSSION

Obwohl Glutathion seit langem bekannt ist, seine chemische Struktur rasch aufgeklärt worden ist, und es in vergleichsweise hoher Konzentration in fast jeder Zelle vorkommt, so ergeben sich über seine Beteiligung an Stoffwechselreaktionen auch heute noch immer wieder Kontroversen. Tatsächlich ist nur bei wenigen Reaktionen eine unmittelbare Beteiligung von Glutathion am Stoffwechselgeschehen wirklich nachgewiesen. Dazu zählt an erster Stelle die Beseitigung von Peroxiden durch die Glutathion-Peroxidase, ein Selenoenzym, dessen Struktur und Funktion aufgeklärt sind **(59)**. Bei dieser Reaktion werden H_2O_2 und organische Peroxide zu Alkoholen reduziert; auf diese Weise werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als Membranbestandteile vor Lipidperoxidation (LPO) geschützt. Der unmittelbare Zusammenhang zwischen GSH-Status und LPO ist von vielen Autoren dokumentiert **(60),(61),(62),(63)**, wobei die Initiierung der LPO anscheinend nicht durch den Mangel an GSH per se entsteht, sondern durch mikrosomale Aktivitäten **(64),(65)**.

Aber auch die Aktivität der GSH-S-Transferase ist von großer Bedeutung für einen intakten Zellstoffwechsel: ihre Hauptfunktion ist der Abfang elektrophiler, meist durch mikrosomale Enzyme aktivierter Fremdstoffe, bevor diese Gelegenheit zur Bindung an 'sensible' Moleküle (DNA, Protein) erhalten **(25),(66)**. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß eine in der Leber vorkommende, selenfreie Form dieses Enzyms zusätzlich GSH-Peroxidase-Aktivität besitzt **(67),(68)**.

Bei vielen anderen Prozessen wird eine Beteiligung von GSH postuliert, aber es kann selten nachgewiesen werden , ob Glutathion dabei wirklich selber involviert ist, oder aber nur als Folge einer vielfältigen Verflechtung der Stoffwech-

selwege mittelbar in Erscheinung tritt. Welche Gründe hat das?
Eine Ursache dafür liegt vielleicht im 'Zwitter'-Charakter des Glutathion: vom Molekulargewicht her ist es größer als die meisten niedermolekularen Substanzen, aber zu klein, um als Protein zu gelten. Vom Bindungstyp her weist es die bei Proteinen übliche alpha-Bindung auf, hat aber zusätzlich eine für Proteine untypische gamma-Peptidbindung, die es möglicherweise vor Proteasen schützt. In Analogie zum aktiven Zentrum eines Enzyms besitzt Glutathion eine reaktive Thiolgruppe, ohne diese aber in die räumliche Struktur eines Proteins einbinden zu können.
Gerade aber die Thiolfunktion bestimmt wesentlich die Eigenschaften des Glutathions durch ihre Fähigkeit, mit anderen Thiolen zu reagieren. Dies geschieht im Sinne von Redoxreaktionen, wobei Reduktionsäquivalente (Elektronen) übertragen werden. Das Redoxpotential von GSH/GSSG liegt bei E_0= -0.24 V, nahe bei dem Wert von Cystein (-0.22 V) **(69)** und dem der meisten Proteinthiole. Daraus folgt, daß das Glutathionsystem durch NADPH (-0.32 V) reduziert werden kann und dann für andere Thiolgruppen als Redoxpuffer wirkt. Es befinden sich somit Thiole verschiedenen Ursprungs permanent im Gleichgewicht, und eine Änderung im Glutathionstatus wird sich schnell anderen Zellkomponenten mitteilen. Dies geschieht entweder nicht-enzymatisch oder unter Einsatz von Thioltranshydrogenasen **(70),(71)**. Besonders effektiv ist diese an 'third messenger' **(32)** erinnernde Reaktion im Fall der oxidierten Glutathionspecies GSSG, die bei mehreren Enzymen über derartige Thiol/Thiol-Wechselwirkungen erhebliche Aktivitätsänderungen verursachen kann **(31)**; so wird beispielsweise die Proteinbiosynthese durch einen Anstieg an GSSG fast vollständig gehemmt **(72)**.

Aus dem angeführten wird klar, daß dem Glutathionstatus (Quotient GSH/GSSG) erheblicher Aussagewert zukommt bezüglich der Vitalität und des Vermögens von Zellen, sich mit oxidativen Stoffwechselbedingungen und Fremdstoffen

auseinanderzusetzen. Bei der Bestimmung dieser Größe spielen drei Aspekte eine Rolle:
Zum einen soll der Glutathionstatus ohne Artefaktbildung möglichst genau erfaßt werden. Hier liegt in praxi das Problem, da bei konventionellen Meßmethoden das Protein durch Säurefällung entfernt werden muß und sich daran eine Neutralisation des GSH-haltigen Überstands anschließt (73); dabei kann unter aeroben Bedingungen erhebliche Autoxidation auftreten (74). Diese wirkt sich besonders in der GSSG-Bestimmung negativ aus, da bereits geringe Oxidation des im hohen Überschuß vorliegenden GSH (3) starke Änderungen der GSSG-Konzentration bewirken.
Zum anderen soll der Glutathionstatus schnell bestimmt werden, bevor sich die durch das Experiment verursachten Verschiebungen anderen Thiolen mitteilen. Die Reaktion der verschiedenen, im Gleichgewicht befindlichen Thiole kann zwar durch Temperaturabsenkung etwas gebremst werden, zumindest was die durch Enzyme katalysierten Reaktionen betrifft. Trotzdem verursacht die zur Aufarbeitung des Zellmaterials erforderliche Zeit möglicherweise Fehler in der Messung.
Schließlich ist noch der tatsächliche Glutathionstatus der einzelnen Zelle interessant. Durch die bei konventionellen Methoden unvermeidbare Mittelwertbildung können selbst ausgeprägte Effekte einzelner Zellen oder Populationen leicht überdeckt werden.

Die Idealvorstellung besteht also in einer Methode, die innerhalb kürzester Zeit die absolute Konzentration von GSH und GSSG in intakten Zellen ermittelt. Bei diesen Begriffen (jedenfalls in puncto intakte Zellen und Zeit!) drängt sich die Durchflußcytometrie (engl. flow cytometry, FCM) als Meßprinzip förmlich auf. FCM arbeitet mit ganzen, intakten Zellen, erfaßt jede einzelne Zelle, benötigt extrem wenig Probenmaterial, ist sehr schnell und kann sogar einzelne Zellen nach Eigenschaften präparativ abtrennen ('sorten'). Die Aufzählung dieser Vorteile zieht sofort die Frage nach

sich, welche Untersuchungen auf diesem Gebiet bisher durchgeführt wurden; hier ist in Anbetracht der Bedeutung, die ein intakter Glutathionstoffwechsel für jede Zelle besitzt, sehr wenig geschehen. Lediglich in (75) wird diese Thematik gestreift, wobei die Autoren Änderungen des Gesamt-Thiolgehalts in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung untersuchten. Weiterer Gegenstand der zitierten Untersuchung war ein Vergleich unterschiedlicher thiolreaktiver Farbstoffe. Dabei wurden sehr widersprüchliche Ergebnisse erhalten: so lieferten Farbstoffe vom Maleimid-Typ bei Vorbehandlung der Zellen mit Thiolblockern höhere Fluoreszenzausbeuten als im Kontrollversuch ohne Thiolblocker! Im Gegensatz dazu wurde mit Bromobimanen unter diesen Bedingungen eine plausibel erscheinende Reduktion der Fluoreszenz erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Grund für die experimentelle Enthaltsamkeit auf diesem Gebiet in der Nichtverfügbarkeit eines FCM-geeigneten Farbstoffs liegt, womit hinreichend spezifisch GSH oder gar GSSG detektiert wird. Die verwendeten Bromobimane binden zwar sehr spezifisch an Thiolgruppen, differenzieren aber nicht nach deren Ursprung (76). Die durch GSH verursachte Bromobimane-Fluoreszenz stellt damit nur einen geringen Teil der erhaltenen Gesamtthiolfluoreszenz dar. Somit aber erfaßt die MB-Thiolfärbung nur sehr hohe Änderungen im GSH-Spiegel. Außerdem ist nicht ohne weiteres feststellbar, ob im gegebenen Falle neben GSH-Änderungen auch Veränderungen im Oxidationszustand von Proteinthiolgruppen bzw. freien Cysteinmolekülen aufgetreten sind. Da diese Gruppen untereinander im Gleichgewicht stehen, fehlt der MB-Methode in jedem Fall die erforderliche Spezifität. Die Stärke der MB-Färbung liegt jedoch in der schnellen Abschätzung des Gesamtthiolstatus lebender Zellen.

Um FCM-Untersuchungen des Glutathionstatus vornehmen zu können und damit der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit gerecht zu werden, wird also ein Farbstoff benötigt, der höhere Anforderungen zu erfüllen hat bezüglich Spezifität, Membranpermeabilität und Fluoreszenzeigenschaften. Von

mehreren getesteten Substanzen erweist sich ortho-Phthaldialdehyd (OPT) als die geeignete Lösung. OPT ist aktiver Bestandteil konventioneller Methoden zur GSH-Bestimmung in Zellhomogenaten **(51),(77),(78),(79)** und setzt sich mit reduziertem Glutathion zu einem fluoreszenten Ringaddukt um **(80)**. Allein aufgrund seines Reaktionsmechanismus besitzt OPT damit eine höhere Spezifität als rein thiolspezifische Farbstoffe, denn es werden gleichzeitig Thiol- und Aminofunktion des Glutathions zur Bindung und Ausbildung des Fluorochroms benötigt.

Die zur Charakterisierung der Farbstoffreaktion hier durchgeführten Versuche stimmen in den Ergebnissen mit denen aus der Literatur zitierten überein und bestätigen die prinzipielle Eignung von OPT zum Nachweis von reduziertem Glutathion. Die Reaktion verläuft konzentrationsabhängig und mit hoher Fluoreszenzausbeute (3.1.3.). Der pH-Wert der Reaktionslösung beeinflußt lediglich die Bildung des fluoreszenten Addukts, nicht aber dessen Intensität (3.1.11.). Anwesenheit von Quecksilbersalzen inhibiert die Fluoreszenzentwicklung vollständig (3.1.4.), während beim analogen Ansatz mit dem Thiolfarbstoff Bromobimane MB eine Restfluoreszenz meßbar bleibt; dieser Effekt erklärt sich aus der Spontanhydrolyse von Bromobimanen in wäßrigem Medium (3.1.9.) und kann bei längeren Inkubationszeiten erhebliche Fehler verursachen.
Störungen im GSH-Nachweis durch Aminosäuren gibt es nur im Fall von Histidin; andere Aminosäuren reagieren nicht mit OPT (3.1.5), auch nicht das über Thiol- und Aminofunktion verfügende Cystein. Hiermit wird klar, daß nicht das alleinige Vorhandensein beider Gruppen zur Ausbildung eines fluoreszenten Addukts führt, sondern zusätzlich eine spezielle räumliche Anordnung der Bindungspartner benötigt wird, was die Spezifität der Reaktion für GSH weiter erhöht. Die zwischen Histidin und OPT ablaufende Reaktion ist schon in **(81)** beschrieben worden und besitzt eine andere Charakteristik: Quecksilbersalze inhibieren kaum, und das Maximum

der Fluoreszenzemission ist längerwellig (3.1.5.). Anwendung von $HgCl_2$ erlaubt somit eine Differenzierung zwischen GSH-Nachweis und der durch Histidin verursachten Störungen. Weitere Störeinflüsse ergeben sich aus der Bindung von OPT an Proteine, aber auch hier zeigen sich andere Charakteristika als bei der Reaktion mit GSH: Proteinthiole sind daran kaum beteiligt, da Thiolblocker nur geringe Unterschiede in der Fluoreszenz bewirken (Beispiel BSA, 3.1.8.), und die meisten getesteten Protein-OPT-Addukte besitzen ein kürzerwelliges Emissionsmaximum als der entsprechende GSH-OPT-Komplex. - An dieser Stelle soll erwähnt werden, daß OPT auch zur Proteindetektion verwendet wird **(82),(83)**; zum Ablauf dieser Reaktion werden aber extreme, nicht zellübliche Bedingungen benötigt (pH >10, Mercaptoethanol).
Im zusammenfassenden Vergleich bezüglich der Eignung zum GSH-Nachweis zeigt OPT deutliche Vorteile gegenüber Monobromobimane MB: OPT besitzt keine Eigenfluoreszenz, zeigt keine Spontanhydrolyse, weist hohe Fluoreszenzausbeute auf, sowie die prinzipiell höhere Spezifität durch gleichzeitige Bindung an Thiol- und Aminofunktion des GSH.

Einen Übergang von der Farbstoffcharakterisierung zur FCM bildet das Fluoreszenzmikroskop. Inkubation von ganzen, intakten Zellen in isotoner 0.5 mM OPT-Lösung resultiert in einer intensiven Blaufluoreszenz, die sich einheitlich über den Zellkörper verteilt und keine weiteren Strukturen sichtbar werden läßt (3.2.). Daß dabei nur vitale Zellen erfaßt werden, läßt sich durch Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI) nachweisen: PI färbt die DNA toter Zellen rot, kann aber wegen seiner Ladung intakte Membranen lebender Zellen nicht permeieren **(84)**. Das Ergebnis ist einleuchtend, da GSH zusammen mit anderen niedermolekularen Substanzen sehr schnell aus defekten, undicht gewordenen Zellen herausdiffundiert und damit in PI-positiven Zellen nicht mehr nachweisbar ist.

Um nun eine Aussage darüber zu erhalten, wie sich die

Fluoreszenz innerhalb von OPT-gefärbten Zellen verteilt und welche Faktoren die Bindung in vivo beeinflussen, werden Lysate von OPT-gefärbten Zellen nach Molekulargewicht durch HPLC aufgetrennt. Es zeigt sich, daß die Methode der Lysatgewinnung dabei eine erhebliche Rolle spielt: wird lediglich durch Ultraschall homogenisiert, ist der quantitativ höchste Fluoreszenzpeak mit derjenigen niedermolekularen Fraktion assoziiert, in der auch das GSH-OPT-Addukt auftritt (3.3.1.). Zusatz von 0.5% SDS zum Lysemedium kehrt indes die Verhältnisse um: Protein-OPT-Addukte liefern jetzt den höchsten Anteil der Gesamtfluoreszenz (3.3.2.). Dieses unterschiedliche Ergebnis kann kontrovers diskutiert werden: SDS verursacht ein 'Auflösen' nahezu aller Bestandteile der gefärbten Zelle (Membranen, Kern, Mitochondrien). Bei der folgenden HPLC wird somit die Summe aller fluoreszenten Zellkomponenten erfaßt. Auf der anderen Seite verursacht die SDS-Solubilisierung ein 'Herausreißen' der Zellbestandteile aus ihrer intracellulär üblichen Umgebung, was möglicherweise in geändertem Quenchverhalten und unterschiedlicher Anfärbbarkeit resultiert. Trotz dieser Überlegungen werden die Zellen mit SDS-haltigen Medien lysiert, da bei alleiniger Ultraschallanwendung keine vollständige Lyse auftritt und der verbleibende Rückstand mögliche Fehlmessungen bedingt.
Unabhängig vom gewählten Lyseverfahren unterscheiden sich hoch-/niedermolekulare OPT-Addukte auf jeden Fall qualitativ: Vor der Färbung zugesetztes $HgCl_2$ führt zum Verschwinden des niedermolekularen Fluoreszenzgipfels (Abb.3.3.5.). Die Fluoreszenz des hochmolekularen Gipfels wird davon nur wenig betroffen. Hier besteht Übereinstimmung zu Modellversuchen im Fluorimeter, wo die Bindung von OPT an Protein im Gegensatz zur Bindung an GSH durch $HgCl_2$ nur wenig gehemmt wird (3.1.4., 3.1.8.). Auch die im Modellversuch gemessene kürzerwellige Fluoreszenzemission von OPT-Proteinaddukten im Vergleich zu GSH-OPT-Addukten (Abb.3.1.8.) wird mit den Zellextrakten analog beobachtet (3.3.4.). Schließlich kann gezeigt werden, daß sich intracelluläres GSH in ganzen

Zellen durch Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Peroxid regelrecht 'titrieren' läßt, ohne die Bindung von OPT ans Protein zu beeinflussen (3.3.6.). Von anderen Autoren wird eine ähnliche Technik verwendet, um GSH per HNMR in intakten Zellen zu bestimmen (85). Interessanterweise gelingt es auch durch Anwendung höherer H_2O_2-Konzentrationen (>1 mM) nicht, die OPT-GSH-Fluoreszenz vollständig zu unterdrücken. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus anderen Untersuchungen (Sies H., pers. Mitteilung) und ist entweder die Folge einer intracellulären GSH-Kompartimentierung (es existiert ein eigenständiger, mitochondrialer GSH-pool (86),(87)), oder aber Resultat der Bemühungen der Zelle, trotz Streßsituation den Glutathionstatus aufrechtzuerhalten.
Deutliche Hinweise darauf, daß die mit der niedermolekularen Fraktion assoziierte Fluoreszenz nahezu vollständig aus GSH-OPT-Addukten besteht, werden auch aus dem Ergebnis der präparativen HPLC mit anschließender Dünnschichtchromatografie erhalten (3.3.7.).
Zusammenfassend läßt sich feststellen: Die Fluoreszenz von OPT-gefärbten Zellen setzt sich zusammen aus der OPT-GSH-Fluoreszenz und einem erheblichen Anteil unerwünschter OPT-Protein-Fluoreszenz; beide unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer Hemmbarkeit durch Thiolblocker und hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften und werden dadurch differenzierbar. Die durch Peroxide verursachte Abnahme der Fluoreszenz resultiert allein aus dem Rückgang der niedermolekularen OPT-GSH-Fluoreszenz und gibt damit hochspezifisch Änderungen im intracelluären GSH-Gehalt wieder. Damit erweist sich OPT als geeignet, um in ganzen Zellen trotz der Gegenwart von Proteinen Änderungen im Glutathionstatus zu detektieren.

Ein wesentlicher Bestandteil der nachfolgend zu besprechenden FCM-Versuche ist die von außen verursachte Manipulation im Glutathion- und Thiolstatus der Zellen und deren Auswirkung im durchflußcytometrischen Ergebnis.

Sollten Substanzen, die bewiesenermaßen den Glutathionstatus beeinflussen (Oxidantien, Thiolblocker, Enzyminhibitoren), ihre Wirkung ebenso im Ergebnis der FCM zeigen, so bestätigt dies die Eignung von OPT zur Messung derartiger Änderungen. Modifikationen des GSH-Gehalts und damit des Glutathionstatus können mit unterschiedlicher Spezifität und Geschwindigkeit erfolgen. Beispiel für einen schnell ablaufenden, aber unspezifischen Eingriff ist das Abblocken von Thiolgruppen durch Quecksilbersalze; die Reaktion ist schnell, da sie ohne Beteiligung von Enzymen spontan abläuft, aber unspezifisch, da alle Thiolgruppen gleichermaßen betroffen sind. Zellen, die nach derartiger Behandlung mit OPT angefärbt und im Durchflußcytometer untersucht werden, zeigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine starke Abnahme der längerwelligen Fluoreszenz, während die kürzerwellige Fluoreszenz nur moderat abgesenkt ist (3.4.3.1.1). In Anbetracht der für diese Versuche verwendeten Filterkombination (F1 400-420nm, F2 420->600nm) läßt sich das Ergebnis folgendermaßen interpretieren: F1 repräsentiert in erster Linie Fluoreszenz aus unerwünschter Bindung von OPT an Protein, während F2 die Summe der Emissionen von Protein-OPT und GSH-OPT darstellt. Diese Interpretation wird gestützt durch die bereits zitierten Ergebnisse der HPLC-Versuche, wonach die Reaktion zwischen OPT und Protein durch Quecksilberchlorid nur wenig inhibiert wurde und das Reaktionsprodukt ein kürzerwelliges Emissionsmaximum aufwies als der entsprechende OPT-GSH-Komplex (3.3.5.).

Durch Verwendung spezieller Thiolblocker lassen sich weitere Informationen erhalten: Inkubation mit PCMS, einer für intakte Membranen impermeablen Quecksilberverbindung **(88)**, verursacht im Vergleich zu $HgCl_2$ einen nur geringen Effekt (3.4.3.2.1.). Damit ist bewiesen, daß das fluoreszente OPT-Produkt tatsächlich im Zellinnern lokalisiert ist. Daß PCMS an der äußeren Zellmembran Thiolgruppen blockiert, ergibt sich aus einer deutlichen Volumenzunahme, die in

Gegenwart von PCMS auftritt und auch bei anderen thiolreaktiven Substanzen beobachtet wird (3.4.3.1.1.). Grund dafür ist wahrscheinlich die Vergiftung von membranständigen Thiolgruppen, die in Carriermolekülen oder Ionenkanälchen an der Aufrechterhaltung der osmotischen Verhältnisse beteiligt sind (89). Nach OPT wird eine solche Volumenzunahme nicht beobachtet, wohl aber im Fall des rein thiolreaktiven Farbstoffs Bromobimane MB. Diese Ergebnisse unterstreichen, daß zur irreversiblen Bindung von OPT die alleinige Anwesenheit von Thiolgruppen nicht ausreicht, sondern daß eine bestimmte räumliche Anordnung mehrerer Bindungspartner erforderlich ist, wie es im Fall der Amino- und Thiolfunktion des GSH erfüllt wird. Cystein spielt quantitativ in der Aminosäurezusammensetzung der meisten Proteine eine untergeordnete Rolle (90) und tendiert zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Damit ergibt sich in Proteinen eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine Kombination aus freier, reduzierter Thiolgruppe in geeignetem Abstand zu einer Aminogruppe, und eine OPT-Bindung bleibt aus. Dies erklärt möglicherweise, warum OPT keine Zellschwellung verursacht.

Nun liefert die Verwendung von Thiolblockern zwar eine Aussage darüber, welcher Prozentsatz der Gesamtfluoreszenz durch die Summe thiolhaltiger Moleküle verursacht wird. Es ist aber nicht zu unterscheiden, wieviel davon tatsächlich aus der Reaktion von OPT mit GSH stammt. Um diese Größe mit der FCM bestimmen zu können, wird von folgender Überlegung ausgegangen: die Versuche zeigen, daß die Spezifität von OPT für GSH zwar ausgeprägt ist, aber nicht in demjenigen Maße, daß die Färbeantwort eine ausschließliche Funktion des GSH-Gehalts ist. Da am Farbstoff selbst keine Modifikationen durchgeführt werden können und es auch nicht gelingt, unspezifische Bindungsstellen durch andere Aldehyde (Formaldehyd) zu maskieren, wird die Spezifität der Färbeantwort dadurch erhöht, daß über intracellulär lokalisierte Enzyme des GSH-Zyklus gezielt Manipulationen im Glutathionstatus verursacht werden. Die dazu parallel

meßbare Änderung der OPT-Fluoreszenz ist in diesem Moment tatsächlich eine alleinige Funktion der momentanen Glutathionumsetzung, wobei die Genauigkeit von der Substratspezifität des Enzyms abhängt, sowie von der Zeit, die der Zelle zur Gegenregulation gelassen wird. Für diese Methode eignet sich die FCM umso mehr, da hier keine zeitaufwendige Homogenisierung nötig ist wie bei der HPLC. In vorherigen Experimenten (3.3.c.) wurde bereits festgestellt, daß sehr gezielt Störungen im Glutathionstatus induzierbar sind, ohne die Farbstoffbindung an Protein zu beeinflussen. Beispiele dafür sind die enzymatisch katalysierte Reduktion von Peroxiden durch GSH, sowie die Übertragung von GSH auf elektrophile Akzeptoren wie DEM. Hierfür wird ein enzymatischer Ablauf postuliert **(91)**. Die mit OPT gemessene Fluoreszenzreduktion als Folge derartiger Behandlung, sowie der zeitliche Verlauf dieser Reaktion, repräsentieren sehr spezifisch Veränderungen im Glutathionstatus. Bestätigt wird dies anschaulich durch eine 'Streßkinetik' (3.4.3.2.1.). Werden Zellen kurzzeitig einer hohen Peroxidkonzentration ausgesetzt und dann gewaschen, so ist nach anfänglichem, steilen Abfall der OPT-Fluoreszenz ein stetiges Ansteigen bis deutlich über den Ausgangswert meßbar. Dieser 'overshoot' als Reaktion auf einen GSH-verbrauchenden Prozeß ist schon von anderen Autoren beschrieben **(92)** und könnte seine Ursache entweder in der Freisetzung von Glutathion aus 'hidden pools' **(93)** oder in einer vermehrten GSH-Synthese als Reaktion auf diese Streßsituation haben. Interessanterweise wird auch nach Verabreichung des alkylierenden Chemotherapeutikums Cyclophosphamid in Granulocyten ein ähnliches Überschießen des intracellulären Glutathiongehalts gemessen **(94)**.

Unerwartet stark senkt H_2O_2 die OPT-Fluoreszenz im Vergleich zu tbuOOH (3.4.3.2.1.c). Das ist insofern erstaunlich, als im Fall von H_2O_2 die Enzyme GSH-Px und Catalase um dieses Substrat konkurrieren, letztere aber ohne Verbrauch von GSH. TbuOOH dagegen kann nur von der GSH-Px

(und der GSH-S-Transferase) abgebaut werden und sollte damit stärkere Änderungen im Glutathionstatus verursachen. Erklärt werden kann dieses Ergebnis aber durch das wesentlich reaktivere Verhalten von H_2O_2 gegenüber GSH, was sich zumindest teilweise in nicht-enzymatischer Oxidation niederschlägt (3.1.10.), **(95)**. Eine weitere Erklärung könnte die unterschiedliche Lipophilie der beiden Peroxide sein, die möglicherweise zu einer Anreicherung von tbuOOH in der Zellmembran führt. Schließlich weist auch noch die GSH-Px unterschiedliche (apparente) Michaelis-Konstanten (K_m) für beide Peroxide auf, bei gleichen Werten für Aktivierungsenergie und Maximalgeschwindigkeit **(96)**. Allerdings ist hier der K_m selber eine Funktion der GSH-Konzentration **(13)**, so daß es schwierig ist abzuschätzen, in wieweit die Catalase mit extrem hoher V_{max}, aber wesentlich höherem K_m-Wert tatsächlich in Konkurrenz zur GSH-Px tritt. Unter diesem Aspekt erscheint tbuOOH als das eher geeignetere, weil spezifischere Substrat zur Titration des intracellulären GSH.

Wesentlich für eine Beurteilung der OPT-Färbung ist die Tatsache, daß die dynamischen Vorgänge der intracellulären GSH-Änderungen in der FCM deutlich beobachtbar sind und mit den Ergebnissen der parallel dazu durchgeführten konventionellen GSH-Bestimmung übereinstimmen (3.4.4.). Dies gilt ebenso für Änderungen im Glutathionstatus, wie sie durch Inkubation in GSH-Prekursoren oder Inhibitoren des Glutathionzyklus induziert werden. In allen untersuchten Fällen verhalten sich die aus der FCM erhaltenen Meßergebnisse konform zu den intracellulär verursachten Manipulationen im Glutathionstoffwechsel. Damit erscheint es gerechtfertigt, die Färbung ganzer, intakter Zellen mit OPT als durchflußcytometrische Meßmethode zur Detektion von Änderungen im Glutathionstatus zu verwenden, obwohl die Bestimmung der absoluten GSH-Konzentration mit dieser Färbung nicht durchführbar ist. Die Aufstellung einer Eichfunktion in der FCM ist zwar möglich und für Parameter wie den intracellulären pH erfolgreich durchgeführt **(56)**, verliert aber in dem

Moment die Grundlage, wenn das Verhältnis zwischen spezifischer, unspezifischer Bindung von Zelltyp zu Zelltyp variiert, wie dies bei OPT und auch bei Bromobimanen der Fall ist. Andererseits ist die hier beschriebene Relativmessung vollständig ausreichend, um Zellen in ihrer Dynamik auf Reizsituationen hin zu untersuchen. Ein anschauliches Beispiel dafür liefert die Inkubation von Tumorzellen in verschiedenen Cytostatika. Dieser 'cytostatische Ansatz' mißt das Vermögen der eingesetzten Therapeutika, Tumorzellen selektiv in ihrer Vitalität zu schädigen, wobei durch den intracellulären pH-Farbstoff ADB und die FCM bereits nach wenigen Stunden Aussagen erhalten werden **(97)**. Nun hat sich interessanterweise der Glutathionstoffwechsel in den letzten Jahren als potentieller Angriffsort einiger Chemotherapeutika herausgestellt **(46),(47),(48)**. Als Beispiel sei hier das Tumortherapeutikum BCNU angeführt, das sich als irreversibler Inhibitor der GSSG-Reduktase erweist **(98)**. Zudem gelang der Nachweis, daß Resistenzen, die während einer Therapie gegen alkylierende Medikamente auftreten, reversibel werden durch Absenkung des intracellulären GSH-Gehalts **(99)** mit Hilfe von BSO, einem Inhibitor der Glutathionbiosynthese **(100)**.

Wird bei einem derartigen cytostatischen Ansatz nun OPT zur Färbung verwendet, lassen sich die einzelnen Chemotherapeutika gut unterscheiden nach ihrer Wirkung auf den GSH-Spiegel (3.4.5): die alkylierenden Substanzen (Cyclophosphamid, BCNU) verursachen einen starken Rückgang, kaum dagegen Adriblastin und Vincristin, für die andere Wirkungsmechanismen postuliert werden **(101)**. Diese Messungen haben gerade im Fall der alkylierenden Chemotherapeutika durchaus klinische Relevanz, da die bereits erwähnte Resistenz gegen diese Substanzklasse verschiedene Ursachen haben kann: sie beruht entweder auf verringerter Aufnahme der Substanz in die Zelle (Transportdefekt) oder auf einer Erhöhung des intracellulären GSH-Spiegels **(102)**, was der Tumorzelle beim Abfang des Moleküls hilft. Hier zu differenzieren, ist eine potentielle Anwendung dieser Färbung. Weiterhin wird die Wirkung von

strahlentherapeutischen (103) und chemotherapeutischen Maßnahmen (104),(105) stark durch den Glutathionstatus moduliert, ebenso der celluläre Influx bestimmter Chemotherapeutika (106). Auch hier liegt eine experimentelle Anwendung der OPT-Färbung.

Versuche zur Inhibierung von Enzymen des Glutathionzyklus wurden schon am Beispiel von BCNU und BSO erwähnt. Logischerweise benötigen diese Substanzen erheblich längere Zeit bis zum Eintritt einer Wirkung als beispielsweise Peroxide; dies ist von Nachteil, da sich inzwischen die im Glutathionstatus ablaufenden Veränderungen dem gesamten Thiolpool der Zelle mitteilen können. Somit reduziert sich die zunächst hochspezifische Manipulation des GSH-Zyklus zeitabhängig in ihrer Spezifität immer weiter. Auch muß bei intakten Zellen damit gerechnet werden, daß mehrere Effekte zur gleichen Zeit auftreten: BCNU zeigt im Vergleich zu BSO eine sehr schnell eintretende Wirkung (3.4.3.3.), die sich nicht allein aus der Inhibierung der GSSG-Reduktase erklärt, sondern die Fähigkeiten dieser Substanz zur in vivo Alkylierung von Thiolen (und damit GSH) deutlich unterstreicht (107).

Ein weiterer Versuch zur Beeinflussung der Enzymatik des Glutathionzyklus wurde mit PZ51 (Ebselen) unternommen. Es handelt sich dabei um eine synthetische, untoxische Selenverbindung, die nach bisherigen Untersuchungen Peroxidase-Aktivität aufweist und als Elektronendonor GSH akzeptiert (108),(109). In diesem Fall sollte eine Inkubation von Zellen mit PZ51 zu einer Erhöhung der Gesamt-GSH-Px-Aktivität führen, Membranpermeabilität vorausgesetzt. Das Meßergebnis der FCM fällt unerwartet aus, da sich in Gegenwart von 30 µM PZ51 mit der OPT-Färbung eine nur geringfügige Zunahme der GSH-Px-Aktivität messen läßt (3.4.6.). Dagegen wird durch 30 µM PZ51 eine ausgeprägte Abnahme freier Thiolgruppen verursacht, wie es durch MB-Färbung nachweisbar ist (3.4.6.). Damit erweist sich PZ51

als membranpermeabel und sehr unspezifisch bezüglich des als Elektronendonors benötigten Thiols.
Messungen an Ehrlich Ascites Zellen zeigen, daß Lymphocyten und Tumorzellen, die in der FCM volumenmäßig gut unterscheidbar sind, sehr unterschiedlich auf PZ51 reagieren (3.4.7.). Während Lymphocyten Volumen und Fluoreszenz kaum ändern, zeigt eine Population von Tumorzellen zeitabhängig eine starke Abnahme MB-anfärbbarer Thiole bei gleichzeitiger, ausgeprägter Volumenzunahme. Dieser Prozeß ist nach etwa 30 Minuten abgeschlossen und resultiert trotz der Volumenänderung nicht in einer Zunahme von toten Zellen, wie mit Propidiumjodid leicht nachzuweisen ist. Erklärungen für dieses Verhalten sind zunächst rein spekulativ; Tatsache ist, daß sich die Anzahl der reduzierten und damit anfärbbaren Thiolgruppen während der PZ51-Inkubation deutlich verringert, ohne daß die Substanz unmittelbar toxisch wirkt. Dies erscheint in sich widersprüchlich und bedarf weiterer Aufklärung.

Wie gerade aus dem letzten Absatz hervorgeht, unterscheiden sich die Aussagen der einzelnen, hier beschriebenen Farbstoffe sehr erheblich. Während mit ADB / PI ein exzellentes System zur intracellulären pH-Bestimmung zur Verfügung steht, fehlen bisher für andere, ähnlich wichtige Parameter die entsprechenden Färbesubstanzen, um die Durchflußcytometrie zu deren Bestimmung einzusetzen. Probleme ergeben sich dabei aus der zu geringen Spezifität des verwendeten Farbstoffs, sowie aus der meist erforderlichen Eichbarkeit der Methode. Von diesen Schwierigkeiten sind gleichermaßen auch Untersuchungen des Glutathionstoffwechsels betroffen, da bis zum heutigen Tage kein hinreichend spezifischer Farbstoff für GSH oder gar GSSG zur Anwendung in der FCM verfügbar ist. Auch ortho-Phthaldialdehyd, welches im Mittelpunkt der hier beschriebenen Versuche steht, kann diesem Anspruch nicht vollständig gerecht werden. Dennoch zeigen die Ergebnisse, daß OPT im Vergleich zu anderen Substanzen wesentliche Vorteile besitzt und zur

Messung von Änderungen im Glutathionstatus in Verbindung mit der Durchflußcytometrie gut geeignet ist. Das Problem unzureichender Spezifität wird dadurch umgangen, daß dem Meßergebnis die hohe Substratspezifität von intracellulär vorkommenden Enzymen des GSH-Zyklus zugrunde liegt. Möglicherweise läßt sich auch das OPT-Molekül durch chemische Modifikation (110) so weit verändern, daß unerwünschte Bindungen an fremde Moleküle weitestgehend unterdrückt werden. Die mit einem derartigen Farbstoff zusätzlich durchführbare Absolutbestimmung intracellulären Glutathions wäre für die Durchflußcytometrie eine wesentliche Bereicherung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine durchflußcytometrische Methode wurde entwickelt zur Detektion von Änderungen des Glutathion - Gehalts ganzer, intakter Zellen. Das Meßprinzip beruht auf der intracellulären Umsetzung von ortho-Phthalaldehyd (OPT) mit Amino- und Thiolfunktion von reduziertem Glutathion (GSH) zu einem fluoreszenten Addukt und anschließender durchflußcytometrischer Mehrparameter-Analyse.

2. Die Reaktion zwischen Farbstoff und Substrat wurde charakterisiert bezüglich der pH-Abhängigkeit, ihrer Spezifität und möglicher Störeinflüsse durch Aminosäuren und Proteine, sowie der Hemmbarkeit durch thiolblockende Substanzen. Aufgrund unterschiedlicher Emissionsspektren und Hemmbarkeiten läßt sich die Reaktion von OPT mit GSH von derjenigen mit Histidin oder Proteinen differenzieren.

3. Lysate OPT-gefärbter Zellen wurden per HPLC nach Molekulargewicht aufgetrennt, um Lokalisation und spektrale Eigenschaften fluoreszenter OPT-Addukte zu untersuchen. Die Gesamtfluoreszenz setzt sich danach zusammen aus Protein-OPT-Komplexen mit kürzerwelligem Emissionsmaximum (408 nm) und längerwelligen GSH-OPT-Komplexen (424 nm). Vorbehandlung des Zellmaterials mit Quecksilberchlorid führt zum vollständigen Fluoreszenzverlust bei der niedermolekularen GSH-haltigen Fraktion, während die hochmolekulare proteinhaltige Fraktion nur moderat beeinflußt wird. Somit repräsentiert die nach Quecksilberbehandlung und OPT-Färbung verbleibende Fluoreszenz die unerwünschte Bindung von OPT an Protein. - Präparative HPLC wurde eingesetzt, um intracellulär entstandene GSH-OPT-Addukte mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie zu identifizieren.

4. Hochspezifische Änderungen im GSH-Status intakter Zellen wurden induziert durch Behandlung mit Peroxiden oder GSH-Precursor-Aminosäuren. Die Ergebnisse der durchflußcyto-

metrischen Messungen OPT-gefärbter Zellen korrelierten gut mit parallel durchgeführten GSH-Bestimmungen an Homogenaten von derart behandelten Zellen. - Weitere Beeinflussungen des GSH-Status wurden durch Inhibitoren der GSSG-Reduktase oder der GSH-Synthetase verursacht. Die erwartete Abnahme an GSH konnte in der durchflußcytometrischen Messung bestätigt werden.

5. Gängige Chemotherapeutika aus der Tumortherapie wurden mit Zellmaterial inkubiert und auf Veränderungen des GSH-Status untersucht. Bei alkylierenden Substanzen änderte sich innerhalb kurzer Zeit das durchflußcytometrische Meßprofil OPT-gefärbter Zellen deutlich.

6. Die Wirkung einer synthetischen niedermolekularen Verbindung (PZ51, Ebselen) mit Peroxidase-Aktivität wurde an Zellmaterial verschiedenen Ursprungs untersucht. Ehrlich Ascites Tumorzellen unterschieden sich durch deutliche Volumenzunahme und gleichzeitigen Verlust an freien Thiolgruppen von Lymphocyten, die durch PZ51 nur wenig beeinflußt wurden.

7. Eigenschaften des thiolreaktiven Farbstoffs Monobromobimane MB und seine Anwendbarkeit in der Durchflußcytometrie wurden untersucht und mit den Ergebnissen der OPT-Färbung verglichen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1)
Hopkins, F.G.
On an autoxidisable constituent of the cell.
Biochem.J. 15: 286 - 305 (1921)

(2)
Hopkins, F.G.
On glutathione: a reinvestigation.
J.Biol.Chem. 84: 269 - 320 (1929)

(3)
Kosower N.S., Kosower E.M.
The glutathione status of cells.
Int.Rev.Cyt. 54: 109 - 160 (1978)

(4)
Högberg J., Kristoferson A.
A correlation between glutathione levels and cellular damage in isolated hepatocytes.
Eur.J.Biochem. 74: 77 - 82 (1977)

(5)
Lindley H.
The reaction of thiol compounds and chloroacetamide.
Biochem.J. 82: 418 - 425 (1962)

(6)
Wallenfels K., Streffer C.
Das Dissoziationsverhalten von Cystein und verwandten SH-Verbindungen.
Biochem.Z. 346: 119 - 132 (1966)

(7)
Streitwieser A.
Solvolytic displacement reactions at saturated carbon atoms.
Chem.Rev. 56: 571 - 744 (1956)

(8)
Fahey R.C., Newton G.L., Arrick B., Overdank-Bogart T., Aley S.B.
Entamoeba histolytica: a eukaryote without glutathione metabolism.
Science 224: 70 - 72 (1984)

(9)
Mills G.C.
Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues.
Arch.Biochem.Biophys. 86: 1 - 5 (1960)

(10)
Mc Lennen G., Oberley L.W., Autor A.P.
The role of oxygen-derived free radicals in radiation induced damage and death of nondividing eucaryotic cells.
Radiat.Res. 84: 122 - 132 (1980)

(11)
van der Zee J., Dubbelman T.M.A.R., van Steveninck J.
Peroxide-induced membrane damage in human erythrocytes.
Biochim.Biophys.Acta 818: 38 - 44 (1985)

(12)
Flohe L., Brand I.
Kinetics of glutathione peroxidase.
Biochim.Biophys.Acta 191: 541 - 549 (1969)

(13)
Flohe L., Loschen G., Günzler W.A., Eichele E.
Glutathione peroxidase,V.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 987 - 999 (1972)

(14)
Flohe L., Loschen G., Günzler W.A., Eichele E.
Glutathione peroxidase,IV.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352: 1401 - 1410 (1971)

(15)
Chance B.P.
The primary and secondary compounds of catalase and methyl or ethyl hydrogen peroxide.
J.Biol.Chem. 179: 1341 - 1369 (1949)

(16)
Chance B., Sies H., Boveris A.
Hydroperoxide Metabolism in mammalian organs.
Physiol.Rev. 59: 527 - 605 (1979)

(17)
Little C., O'Brien P.J.
An intracellular GSH-Peroxidase with a lipid peroxide substrate.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 31: 145 - 150 (1968)

(18)
Grossmann A., Wendel A.
Reaktivität von Glutathion-Peroxidase mit Fettsäure- und Lipidhydroperoxiden.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364: 334 - 335 (1983)

(19)
Tolbert N.E.
Peroxisomal redox enzymes.
Meth.Enzym. 52: 493 - 505 (1978)

(20)
Orrenius S., Moldeus P.
The multiple roles of glutathione in drug metabolism.
Trends Phar. 5: 432 - 435 (1984)

(21)
Babson J.R., Abell N.S., Reed D.J.
Protective role of the glutathione redox cycle against adriamycin-mediated toxicity in isolated hepatocytes.
Bioch.Pharm. 30: 2299 - 2304 (1981)

(22)
Feuerstein S., Konz K.H., Wendel A.
Drug-induced lipid peroxidation in mouse liver.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 359: 1039 - 1040 (1978)

(23)
Alper T.
Low oxygen enhancement ratios for radiosensitive bacterial strains, and the probable interaction of two types of primary lesion.
Nature 217: 862 - 863 (1968)

(24)
Dechavanne P.J., Malaise E.P., Revesz L.
Radiation survival of glutathione deficient human fibroblasts in culture.
Br.J.Radiology 54: 361 - 362 (1981)

(25)
Chasseaud L.F.
The role of glutathione and glutathione-S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents.
Adv.Canc.Res. 29: 175 - 274 (1979)

(26)
Levine W.G.
Glutathione, lipid peroxidation and regulation of cytochrome P-450 activity.
Life Sci. 31: 779 - 784 (1982)

(27)
Boyland E., Chasseaud L.F.
The role of glutathione and glutathione-S-transferases in mercapturic acid biosynthesis.
Adv.Enzym. 32: 173 - 219 (1969)

(28)
Hird F.J.R.
The reduction of serum albumin, insulin, and some simple disulphides by glutathione.
Biochem.J. 85: 320 - 326 (1962)

(29)
Jackson R.C., Harrap K.R., Smith C.A.
Binding of glutathione and cysteine to cellular protein by mixed disulphide bonds.
Biochem.J. 110: 37 - 37 (1968)

(30)
Fava A., Iliceto A., Camera E.
Kinetics of the thiol disulfide exchange.
J.Am.Chem.Soc. 79: 833 - 838 (1957)

(31)
Gilbert H.F.
Redox control of enzyme activities by thiol/ disulfide exchange.
Meth.Enzym. 107: 330 - 351 (1984)

(32)
Gilbert H.F.
Biological Disulfides: The third messenger?
J.Biol.Chem. 257: 12086 - 12091 (1982)

(33)
Ernest M.J., Kim K.H.
Regulation of rat liver glycogen synthetase.
J.Biol.Chem. 248: 1550 - 1555 (1973)

(34)
Guidi G., Schiavon R., Biasioli A., Perona G.
The enzyme glutathione peroxidase in arachidonic acid metabolism of human platelets.
J.Lab.Clin.Med. 104: 574 - 582 (1984)

(35)
Zehavi-Willner T., Kosower E.M., Hunt T., Kosower N.S.
The effects of the thiol-oxidizing agent diamide on initiation and translation in rabbit reticulocytes.
Biochim.Biophys.Acta 228: 245 -251 (1971)

(36)
Holmgren A.
Hydrogen donor system for E. coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73: 2275 - 2279 (1976)

(37)
Orlowski M., Meister A.
The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 67: 1248 - 1255 (1970)

(38)
Werman R., Carlen P.L., Kushnir M., Kosower E.M.
Effect of the thiol-oxidizing agent, diamide, on acetylcholine release at the frog endplate.
Nature NB 233: 120 - 121 (1971)

(39)
Kosower N.S., Zipser Y., Faltin Z.
Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells.
Biochim.Biophys.Acta 691: 345 - 352 (1982)

(40)
Rebhun L.I., Miller M., Schnaitman T.C., Nath J., Mellon M.
Cyclic nucleotides, thioldisulfides status of proteins, and cellular control processes.
J.Supramol.Struct. 5: 199 - 219 (1976)

(41)
Hamilos D.L., Wedner H.J.
The role of glutathione in lymphocyte activation.
J.Immunol. 135: 2740 - 2747 (1985)

(42)
Graw J.
Biochemische Untersuchungen einer dominant vererbbaren Linsentrübung bei der Maus.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364: 334 - 334 (1983)

(43)
Jewell S.A., Bellomo G., Thor H., Orrenius S., Smith M.T.
Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis.
Science 217: 1257 - 1259 (1982)

(44)
Modig H.
Cellular mixed disulfide between thiols and proteins and their possible implication for radiation protection.
Bioch.Pharm. 17: 177 - 186 (1968)

(45)
Harrap K.R., Jackson R.C., Riches P.G., Smith C.A., Hill B.T.
The occurence of protein-bound mixed disulfides in rat tissues.
Biochim.Biophys.Acta 310: 104 - 110 (1973)

(46)
Arrick B.A., Nathan C.F., Griffith O.W., Cohn Z.A.
Glutathione depletion sensitizes tumor cells to oxidative cytolysis.
J.Biol.Chem. 257: 1231 - 1237 (1982)

(47)
Gurtoo H.L., Hipkens J.H., Sharma S.D.
Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide.
Cancer Res. 41: 3584 - 3591 (1981)

(48)
Somfai-Relle S., Suzukake K., Vistica B.P., Vistica D.T.
Glutathione conferred resistance to antineoplastics.
Canc.Tr.Rev. 11: 43 - 54 (1984)

(49)
Dunning W.F.
Steroid-responsive neoplasms in rats and mice.
In: Pincus G., Vollmer E.P. (Hrsg.)
Biological activities of steroids in relation to cancer.
S.225 - 256. Academic Press, New York and London, 1960.

(50)
Sies H., Akerboom T.P.M.
Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues.
Meth.Enzym. 105: 445 - 451 (1984)

(51)
Hissin P.J., Hilf R.
A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues.
Analyt.Bioc. 74: 214 - 226 (1976)

(52)
Tietze F.
Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione.
Analyt.Bioc. 27: 502 - 522 (1969)

(53)
Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193: 265 - 275 (1951)

(54)
Kachel V., Glossner E., Kordwig E., Ruhenstroth-Bauer G.
Fluvo-Metricell, a combined cell volume and cell fluorescence analyser.
J.Histochem.Cytochem. 25: 804 - 812 (1977)

(55)
Benker G., Kachel V., Valet G.
A computer controlled data managing system for multiparameter flow cytometric analyses.
In: Laerum O., Lindmo T., Thoroud E. (Hrsg.)
Flow cytometry IV. S.116 - 119. Universitetsforlaget Bergen, Bergen, Norway, 1980.

(56)
Valet G., Raffael A., Moroder L., Wünsch E., Ruhenstroth - Bauer G.
Fast intracellular pH determination in single cells by flow-cytometry.
Naturwiss. 68: 265 - 266 (1981)

(57)
Kosower N.S., Kosower E.M., Newton G.L., Ranney H.M.
Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76: 3382 - 3386 (1979)

(58)
Treumer J., Valet G.
Flow-cytometric determination of glutathione alterations in vital cells by o-phthaldialdehyde staining.
Exp.Cell.Res. 163: 518 - 524 (1986)

(59)
Ladenstein R., Epp O., Wendel A.
Structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362: 392 - 393 (1981)

(60)
Capel I.D., Thornley A.C.
Lipoperoxide levels,glutathione status and glutathione peroxidase activity in liver and tumors of mice bearing the lewis lung carcinoma.
Canc.Biochem.Biophys. 6: 167 - 172 (1983)

(61)
Fujii S., Dale G.L., Beutler E.
Glutathione-dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane.
Blood. 63: 1096 - 1101 (1984)

(62)
Farooqui M.Y.H., Ahmed E.A.
Circadian periodicity of tissue glutathione and its relationship with lipid peroxidation in rats.
Life Sci. 34: 2413 - 2418 (1984)

(63)
Gibson D.D., Hawrylko J., McCay P.B.
GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes.
Lipids. 20: 704 - 711 (1985)

(64)
Bast A., Haenen G.R.M.M.
Cytochrom P-450 and glutathione: what is the significance of their interrelationship in lipid peroxidation?
Trends.Bioc. 9: 510 - 513 (1984)

(65)
Reiter R., Wendel A.
Chemically-induced glutathione depletion and lipid peroxidation.
Chem.-Biol.Interact. 40: 365 - 374 (1982)

(66)
Ketterer B., Meyer D., Taylor J., Burchell B.
Glutathione transferases and their role in xenobiotic metabolism.
Trends.Phar. 5: 319 - 320 (1984)

(67)
Lawrence R.A., Burk R.F.
Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 71: 952 - 958 (1976)

(68)
Prohaska J.R., Ganther H.E.
Glutathione peroxidase activity of glutathione -S- transferases purified from rat liver.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 76: 437 - 445 (1977)

(69)
Rost J., Rapoport S.
Reduction-potential of glutathione.
Nature. 201: 185 - 185 (1964)

(70)
Carmichael D.F., Keefe M., Pace M., Dixon J.E.
Interchangeable forms of thiol:protein disulfide oxidoreductase.
J.Biol.Chem. 254: 8386 - 8390 (1979)

(71)
Chang S.H., Wilken D.R.
Participation of the unsymmetrical disulfide of coenzyme A and glutathione in an enzymatic sulfhydryl-disulfide interchange.
J.Biol.Chem. 241: 4251 - 4260 (1966)

(72)
Kosower N.S., Vanderhoff G.A., Benerofe B., Hunt T.
Inhibition of protein synthesis by glutathione disulfide in the presence of glutathione.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 45: 816 - 821 (1971)

(73)
Anderson M.
Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples.
Meth.Enzym. 113: 548 - 555 (1985)

(74)
Akerboom T.P.M., Sies H.
Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples.
Meth.Enzym. 77: 373 - 382 (1981)

(75)
Durand R.E., Olive P.L.
Flow cytometry techniques for studying cellular thiols.
Radiat.Res. 95: 456 - 470 (1983)

(76)
Fahey R.C., Newton G.L., Dorian R., Kosower E.M.
Analysis of biological thiols: derivatization with monobromotrimethylammoniobimane and characterization by electrophoresis and chromatography.
Analyt.Bioc. 107: 1 - 10 (1980)

(77)
Mokrasch L.C., Teschke E.J.
Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay.
Analyt.Bioc. 140: 506 - 509 (1984)

(78)
McNeil T.L., Beck L.V.
Fluorometric estimation of GSH-OPT.
Analyt.Bioc. 22: 431 - 441 (1968)

(79)
Cohn V.H., Lyle J.
A fluorometric assay for glutathione.
Analyt.Bioc. 14: 434 - 440 (1966)

(80)
Simons S.S., Johnson D.F.
Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: fluorescence properties of 1-alkyl(and aryl)thio -2- alkyl-isoindoles.
Analyt.Bioc. 90: 705 - 725 (1978)

(81)
Hakanson R., Rönnberg A.L., Sjölund K.
Fluorometry of histidine and peptides.
Analyt.Bioc. 59: 98 - 109 (1974)

(82)
Weidekamm E., Wallach D.F.H., Flückinger R.
A new sensitive, rapid fluorescence technique for the determination of proteins in gel electrophoresis and in solution.
Analyt.Bioc. 54: 102 - 114 (1973)

(83)
Mendez E., Gavilanes J.G.
Fluorometric detection of peptides after column chromatography or on paper: o-phthalaldehyde and fluorescamine.
Analyt.Bioc. 72: 473 - 479 (1976)

(84)
Krishan A.
Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining.
J.Cell.Biol. 66: 188 - 193 (1975)

(85)
Rabenstein D.L., Brown D.W., McNeil C.J.
Determination of glutathione in intact and hemolyzed erythrocytes by titration with tert-butyl hydroperoxide with end point detection by ^{1}H nuclear magnetic resonance spectrometry.
Analyt.Chem. 57: 2294 - 2299 (1985)

(86)
Meredith M.J., Reed D.J.
Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte.
J.Biol.Chem. 257: 3747 - 3753 (1982)

(87)
Schnellmann R.G., Mandel L.J.
Intracellular compartimentation of glutathione in rabbit renal proximal tubules.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 133: 1001 - 1005 (1985)

(88)
Velick S.F.
Coenzyme binding and the thiol groups of glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 203: 563 - 573 (1953)

(89)
Plagemann P.G.W., Wohlhueter R.M.
Effect of sulfhydryl reagents on nucleoside transport in cultured mammalian cells.
Arch.Biochem.Biophys. 233: 489 - 500 (1984)

(90)
Tristram G.R., Smith R.H.
The amino acid composition of some purified proteins.
Adv.Prot.Chem. 18: 227 - 318 (1963)

(91)
Boyland E., Chasseaud L.F.
Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds.
Biochem.J. 104: 95 - 102 (1967)

(92)
Williamson J.M., Boettcher B., Meister A.
Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79: 6246 - 6249 (1982)

(93)
Palekar A.G., Tate S.S., Meister A.
Decrease in glutathione levels of kidney and liver after injection of methionine sulfoximine into rats.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 62: 651 - 657 (1975)

(94)
Carmichael J., Adams D.J., Ansell J., Wolf C.R.
Glutathione and glutathione transferase levels in mouse granulocytes following cyclophosphamide administration.
Cancer Res. 46: 735 - 739 (1986)

(95)
Günzler W.A., Vergin H., Müller I., Flohe L.
Glutathion peroxidase,VI.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1001 - 1004 (1972)

(96)
Flohe L.
Glutathion peroxidase: fact and fiction.
Ciba Found.Symp. 65: 95 - 122 (1979)

(97)
Valet G., Warnecke H.H., Kahle H.
New possibilities of cytostatic drug testing on patient tumor cells by flow cytometry. **Blut** 49: 37 - 43 (1984)

(98)
Frischer H., Ahmad T.
Severe generalized glutathione reductase deficiency after antitumor chemotherapy with BCNU.
J.Lab.Clin.Med. 89: 1080 - 1091 (1977)

(99)
Somfai-Relle S., Suzukake K., Vistica B.P., Vistica D.T.
Reduction in cellular glutathione by buthionine sulfoximine and sensitization of murine tumor cells resistant to L-phenylalanine mustard.
Bioch.Pharm. 33: 485 - 490 (1984)

(100)
Griffith O.W., Meister A.
Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine.
J.Biol.Chem. 254: 7558 - 7560 (1979)

(101)
Calabresi P., Parks R.E.
In: Gilman A.G., Goodman L.S., Gilman A. (Hrsg.)
The pharmacological basis of therapeutics. S. 1249 - 1313.
Macmillan Publishing, New York, 1980.

(102)
Green J.A., Vistica D.T., Young R.C., Hamilton T.C., Rogan A.M., Ozols R.F.
Potentiation of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion.
Cancer Res. 44: 5427 - 5431 (1984)

(103)
Bump E.A., Yu N.Y., Brown J.M.
Radiosensitization of hypoxic tumor cells by depletion of intracellular glutathione.
Science 217: 544 - 545 (1982)

(104)
Andrews P.A., Murphy M.P., Howell S.B.
Differential potentiation of alkylating and platinating agent cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells by glutathione depletion.
Cancer Res. 45: 6250 - 6253 (1985)

(105)
Tomashefsky P., Astor M., deVere White R.
Relationship between thiol depletion and chemosensitization in a transplantable murine bladder tumor.
J.Nat.Canc. 74: 1233 - 1238 (1985)

(106)
Leszczynska-Bisswanger A., Pfaff E.
Effect of depletion of cellular glutathione on methotrexate influx, efflux and retention in hepatocytes.
Bioch.Pharm. 34: 1627 - 1634 (1985)

(107)
Carter S.K., Schabel F.M., Broder L.E., Johnston T.P.
1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) and other nitrosoureas in cancer treatment.
Adv.Canc.Res. 16: 273 - 332 (1972)

(108)
Müller A., Cadenas E., Graf P., Sies H.
A novel biologically active seleno-organic compound - I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ51 (Ebselen).
Bioch.Pharm. 33: 3235 - 3239 (1984)

(109)
Wendel A., Fausel M., Safayhi H., Tiegs G., Otter R.
A novel biologically active seleno-organic compound - II. Activity of PZ51 in relation to glutathione peroxidase.
Bioch.Pharm. 33: 3241 - 3245 (1984)

(110)
Sternson L.A., Stobaugh J.F., Repta A.J.
Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyde - like fluorogenic reagents.
Analyt.Bioc. 144: 233 - 246 (1985)

LEBENSLAUF

Jürgen Treumer

9.Mai 1953	geboren in Flensburg als Sohn der Drs.med. Karlheinz und Ursula Treumer geb. Mirswa
März 1960	Einschulung in die Waldschule, Flensburg
April 1964	Eintritt in das Alte Gymnasium, Flensburg
Juni 1973	Abitur
Sept. 1973	Berufliche Tätigkeit als Elektroniker bei der Fa. Storno Electronic, Flensburg
April 1974	Beginn des Chemie-Studiums an der Universität Kiel
Okt. 1974	Beginn des Biochemie-Studiums an der Universität Tübingen
Dez. 1981	Mündliche Diplomprüfung, Hauptfach: Biochemie, Nebenfach: Mikrobiologie.
Feb. 1982 bis Sept. 1983	Diplomarbeit am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof.D.Mecke und der Betreuung von Dr.A.Jung, Thema: 'Biochemische Untersuchungen zum Eisen-Stoffwechsel der erythrocytären Formen von Malariaerregern (Plasmodium vinckei)'.
Nov. 1983 bis Mai 1986	Promotion unter Anleitung von Prof.D.Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen und am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Betreuung von Prof.G.Valet, Thema: 'Durchflußcytometrische Untersuchungen zum Glutathionstoffwechsel intakter Zellen'.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof.E.Bayer, Prof.V.Braun, Prof.U.Feine, Prof.K.Grell,
Prof.J.Guglielmi, Prof.H.Hagenmaier, Prof.H.Krüger,
Prof.H.Mauser, Prof.D.Mecke, Prof.H.Metzner, Prof.K.Mörike,
Prof.H.Probst, Prof.H.Remmer, Prof.J.Strähle, Prof.G.Weitzel,
Prof.A.Wendel, Prof.H.Zähner.

Druck Kohler Tübingen